

Aus dem Institut für Tropenmedizin Berlin
Der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Polyklonale Infektionen mit *Plasmodium falciparum* in der Schwangerschaft:

Untersuchungen zur Diversität und Multiplizität von *Plasmodium-falciparum*-
Infektionen bei Gebärenden aus dem holoendemischen Malariagebiet von
Agogo (Ghana)

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Nils Eckert
geboren in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. Klaus Stark
2. Prof. Dr. med. Nothdurft
3. Prof. Dr. med. Presber

Datum der Promotion: 10.05.2004

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Malaria | 8 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 8 |
| 1.1.2 | Entwicklungszyklus von Plasmodien | 9 |
| 1.1.3 | Klinik der Malaria tropica | 9 |
| 1.2 | Immunität gegen Malaria | 10 |
| 1.2.1 | Teilimmunität | 11 |
| 1.2.2 | Prämunitio durch chronische Infektion mit <i>P. falciparum</i> | 12 |
| 1.3 | Genetische Diversität von <i>P. falciparum</i> | 13 |
| 1.4 | Multiplizität der Infektion mit <i>P. falciparum</i> | 15 |
| 1.5 | Malaria in der Schwangerschaft | 16 |
| 1.6 | Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 2 | Patientinnen, Material und Methoden | 21 |
| 2.1 | Studienort | 21 |
| 2.2 | Studiengruppe | 22 |
| 2.3 | Klinische Untersuchungen | 22 |
| 2.4 | Gewinnung, Lagerung, Aufbereitung und Transport der Blutproben | 23 |
| 2.5 | Hämatologische Untersuchungen | 23 |
| 2.6 | Mikroskopische Untersuchungen | 24 |
| 2.7 | Bestimmung von Chloroquin und Pyrimethamin | 24 |
| 2.8 | Extraktion genomischer DNA | 25 |
| 2.8.1 | Substanzen | 26 |
| 2.8.2 | Geräte | 26 |
| 2.8.3 | Protokoll | 26 |
| 2.9 | Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) | 27 |
| 2.10 | Nachweis einer Infektion mit <i>P. falciparum</i> durch PCR | 27 |
| 2.10.1 | Substanzen | 27 |
| 2.10.2 | Geräte | 28 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.10.3 | PCR-Protokoll | 28 |
| 2.10.4 | Längenbestimmung der DNA- Amplifikate durch Gel- Elektrophorese | 29 |
| 2.10.4.1 | Substanzen | 30 |
| 2.10.4.2 | Geräte | 30 |
| 2.10.4.3 | Protokoll | 30 |
| 2.11 | Genotypisierung von <i>P. falciparum</i> | 31 |
| 2.11.1 | Geräte | 31 |
| 2.11.2 | Substanzen | 31 |
| 2.11.2.1 | Protokoll | 32 |
| 2.12 | Nachweis der Längenpolymorphismen von <i>msp-1</i> und <i>msp-2</i> | 34 |
| 2.12.1 | Substanzen | 34 |
| 2.12.2 | Geräte | 34 |
| 2.12.3 | Protokoll | 35 |
| 2.13 | Allel-Einteilung entsprechend der Basenpaarlänge der PCR-Amplifikate | 36 |
| 2.14 | Multiplizität der Infektion mit <i>P. falciparum</i> | 36 |
| 2.15 | Statistische Berechnungen | 38 |
| 2.15.1 | Assoziationsberechnungen | 38 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Studiengruppe | 41 |
| 3.1.1 | Wohnort, Alter, Parität | 41 |
| 3.1.2 | Hb-Konzentrationen und Anämie | 41 |
| 3.1.3 | Gestationsalter und Geburtsgewicht | 41 |
| 3.2 | Parasitendichten in Bezug zur Parität | 43 |
| 3.2.1 | Plazentare Parasitendichten | 43 |
| 3.2.2 | Periphere Parasitendichten | 44 |
| 3.3 | Diversität von <i>P. falciparum</i> | 45 |
| 3.3.1 | Diversität von <i>P. falciparum</i> in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten | 45 |
| 3.3.2 | Vergleich des Infektionsmusters plazentar und peripher gewonnener Isolate | 47 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.3.3 | Einflussfaktoren auf die Prävalenz einzelner Genotypen von <i>P. falciparum</i> | 48 |
| 3.3.3.1 | Wohnort der Patientinnen | 48 |
| 3.3.3.2 | Parität | 48 |
| 3.3.3.3 | Alter der Patientinnen | 48 |
| 3.3.3.4 | Einnahme von antiparasitären Medikamenten (Pyrimethamin, Chloroquin) | 49 |
| 3.3.4 | Effekte einer Infektion durch bestimmte Genotypen von <i>P. falciparum</i> | 50 |
| 3.3.4.1 | Mütterliche Anämie | 50 |
| 3.3.4.2 | Vermindertes Geburtsgewicht (LBW) | 50 |
| 3.3.4.3 | Frühgeburtnlichkeit | 51 |
| 3.4 | Multiplizität der Infektion mit <i>P. falciparum</i> | 52 |
| 3.4.1 | Multiplizität der Infektion plazentar und peripher gewonnener Isolate | 52 |
| 3.4.2 | Korrelation der Multiplizität der Infektion peripher und plazentar gewonnener Isolate | 53 |
| 3.4.3 | Einflussfaktoren auf die Multiplizität der Infektion | 54 |
| 3.4.3.1 | Parasitendichten der Infektion | 54 |
| 3.4.3.2 | Stadien der plazentaren Infektion | 55 |
| 3.4.3.3 | Alter der Patientin | 56 |
| 3.4.3.3.1 | Plazentar gewonnene Isolate | 58 |
| 3.4.3.3.2 | Peripher gewonnene Isolate | 59 |
| 3.4.3.3.3 | Korrelation von Multiplizität der Infektion und Parasitendichte in Bezug zur Parität | 60 |
| 3.4.3.4 | Wohnort | 60 |
| 3.4.3.5 | Saison | 61 |
| 3.4.3.6 | Antiparasitäre Medikamente (Chloroquin, Pyrimethamin) | 61 |
| 3.4.4 | Assoziation zwischen Multiplizität und klinischer Manifestation der Malaria | 62 |
| 3.4.4.1 | Anämie | 62 |
| 3.4.4.2 | Frühgeburtnlichkeit | 63 |
| 3.4.4.3 | Vermindertes Geburtsgewicht | 64 |
| 3.5 | Multivariate Analyse der Einflussfaktoren eine Anämie | 65 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | Multivariate Analyse der Einflussfaktoren für Frühgeburtlichkeit | 65 |
| 3.7 | Multivariate Analyse der Einflussfaktoren für ein LBW | 65 |
| 4 | Diskussion | 77 |
| 4.1 | Diskussion der Methoden | 78 |
| 4.1.1 | Studiendesign | 78 |
| 4.2 | Diskussion der Ergebnisse | 82 |
| 4.2.1 | <i>P.-falciparum</i> -Infektionen in der Schwangerschaft | 82 |
| 4.2.2 | Diversität von <i>P. falciparum</i> | 83 |
| 4.2.3 | Multiplizität der Infektion mit <i>P. falciparum</i> | 91 |
| 4.3 | Schlussfolgerung | 96 |
| 5 | Zusammenfassung | 98 |
| | Literaturverzeichnis | 100 |
| | Abbildungsverzeichnis | 106 |
| | Tabellenverzeichnis | 107 |
| | Bezugsquellen | 109 |
| | Danksagung | 110 |
| | Erklärung | 111 |
| | Lebenslauf | 112 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| CLQ | Chloroquin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid) |
| DNTP | Desoxyribonukleotide |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EZ | Erythrozytenzahl |
| h | Stunde |
| Hb | Hämoglobin |
| Hkt | Hämatokrit |
| IgG | Immunglobulin G |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| LBW | vermindertes Geburtsgewicht, (engl. Low Birth Weight) |
| M | molar |
| MCH | mittleres korpuskuläres Hämoglobin |
| MCV | mittleres korpuskuläres Volumen |
| MSP-1 | Merozoiten-Oberflächen-Protein-1, (merozoite-surface-protein-1) |
| MSP-2 | Merozoiten-Oberflächen-Protein-2, (merozoite-surface-protein-2) |
| msp-1 | für Merozoiten-Oberflächen-Protein-1 kodierendes Gen |
| msp-2 | für Merozoiten-Oberflächen-Protein-2 kodierendes Gen |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid) |
| μM | micromolar |
| n | Fallzahl |
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| OR | engl.: Odds Ratio |

| | |
|----------------|---|
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| periph. Isolat | peripher venös gewonnenes <i>P.-falciparum</i> -Isolat |
| plaz. Isolat | plazentar gewonnenes <i>P.-falciparum</i> -Isolat |
| PPM | partus praematurus (Frühgeburt) |
| PYR | Pyrimetamin |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid) |
| SSW | Schwangerschaftswochen |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | 2-Amino-2 (hydroxymethyl)–propan-1,3-diol |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| v | Volumenanteil |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| vs. | Versus |
| (w/v) | Masse (engl.: weight) pro Volumen |

1 Einleitung

Die Malaria ist heute, mehr als 100 Jahre nach Entdeckung der Plasmodien als Erreger durch Laveran (1880) und des parasitären Kreislaufs durch Ross (1897), noch immer die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit des Menschen. Weltweit sind jährlich bis zu 500 Millionen Menschen von dieser Infektionskrankheit betroffen (WHO 2000). In Endemiegebieten haben schwangere Frauen neben Kleinkindern ein erhöhtes Risiko, an einer Malaria durch *Plasmodium falciparum* zu erkranken (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Sullivan *et al.* 1999; Beeson *et al.* 2000; Menendez *et al.* 2000; Saute *et al.* 2002). Die Malaria in der Schwangerschaft kann unter anderem eine mütterliche Anämie, ein vermindertes Geburtsgewicht sowie Frühgeburtlichkeit verursachen (Ordi *et al.* 1998; Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000). Das Risiko einer Erkrankung ist während der ersten Schwangerschaft besonders hoch, bei späteren Schwangerschaften geringer, nicht aber aufgehoben (Diagne *et al.* 1997; Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000). Als Ursache hierfür wird die nur allmähliche Entwicklung einer effektiven Immunerkennung von speziell in der Schwangerschaft exprimierten parasitären Antigenen angesehen (Fried *et al.* 1996; Fried *et al.* 1998; Beeson *et al.* 2000).

Erregertypen, die eine besondere Bedeutung für Schwangere haben, bilden Oberflächenproteine aus, mittels derer sie an plazentare Strukturen binden. Charakteristischerweise sequestrieren die mit diesen speziellen Stämmen von *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im intervillösen Raum der Plazenta (Beeson *et al.* 2001; Scherf *et al.* 2001). Hierbei wird von einer plazentaren Malaria gesprochen. Die Parasitendichten bei einer plazentaren Malaria sind somit in der Plazenta häufig hoch. Bedingt durch diese Sequestration können jedoch plazentare Infektionen in bis zu 50% der Fälle im peripheren Blut nicht mikroskopisch nachgewiesen werden (Desowitz *et al.* 1992; Leke *et al.* 1999; Mockenhaupt *et al.* 2002). Dagegen scheint jedoch der Parasitennachweis im peripheren Blut trotz plazentarer Sequestration durch den Nachweis von erregerspezifischer DNA durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in nahezu 100% möglich zu sein (Mockenhaupt *et al.* 2002).

P. falciparum weist eine hohe genetische Diversität auf (Smith *et al.* 1999; Snounou *et al.* 1999). In Endemiegebieten sind die häufig chronisch verlaufenden Infektionen mit *P. falciparum* in der Regel polyklonal. Man spricht in diesen Fällen von multiplen Infektionen bzw. von der Multiplizität der Infektion (Beck *et al.* 1997; Färnert *et al.* 1999). Es gibt bei Kindern und Erwachsenen Anhalt dafür, dass die Multiplizität der Infektion eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer natürlichen Immunität spielt (Smith *et al.* 1999). Bei Schwangeren jedoch ist bis heute wenig über die Verbreitung und Bedeutung polyklonaler

Infektionen mit *P. falciparum* bekannt. Zudem liegen in den bisher veröffentlichten Studien widersprüchliche Ergebnisse vor (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Es ist größtenteils unklar, ob die Multiplizität einer Infektion sowie eine Infektion mit bestimmten Genotypen (Stämmen) einen Einfluss auf die Morbidität und den Verlauf einer Schwangerschaft und die fetale Entwicklung hat. Darüber hinaus ist nicht endgültig geklärt, ob alle oder nur ein Teil der zahlreichen Parasiten in der Plazenta sequestrieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, es die Multiplizität der Infektion und Diversität von *P. falciparum* bei gebärenden Frauen des holoendemischen Malariagebiets von Agogo (Ghana) mittels PCR-Genotypisierung zu untersuchen. Diese Untersuchung erfolgt durch den Nachweis und die Typisierung der hochpolymorphen Gene *msp-1* (*merozoite-surface-protein-1*) und *msp-2* (*merozoite-surface-protein-2*), die für die Merozoiten-Oberflächen-Proteine kodieren. Es soll erforscht werden, ob die Multiplizität der Infektion und die Infektion mit speziellen Genotypen von *P. falciparum* mit einer Anämie, einem verminderten Geburtsgewicht oder einer Frühgeburt assoziiert sind. Zudem wird untersucht, inwiefern bestimmte Faktoren (Alter, Parität, Parasitendichte der Infektion, Wohnort) die Multiplizität der Infektion und die Infektion mit bestimmten Genotypen beeinflussen. Weiterhin werden in der Plazenta nachgewiesene Genotypen mit in der peripheren Zirkulation vorhandenen Genotypen verglichen, um festzustellen, ob es sich bei den in der Plazenta bestimmten um eine spezifische Subpopulation von *P. falciparum* handelt.

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie

Über 40% der Weltbevölkerung lebt in Gebieten, in denen die Malaria als endemische oder epidemische Erkrankung auftritt. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation enden jedes Jahr 2-3 Millionen Erkrankungen tödlich. Weltweit sind jährlich bis zu 500 Millionen Menschen von dieser Infektionskrankheit betroffen (WHO 2000). Die Mehrheit aller Erkrankungen und tödlichen Verläufe betreffen Kleinkinder und schwangere Frauen in Gebieten südlich der Sahara (WHO 2000). Der Versuch, die Malaria durch die flächenhafte Einführung von Chloroquin als Antimalariamedikament und den Einsatz von Insektiziden wie DDT zu besiegen, ist nach anfänglichen Erfolgen fehlgeschlagen. Seit Mitte der 70er Jahre ist ein deutlicher Wiederanstieg der Krankheitsfälle beobachtet worden. Multiresistente Erreger haben sich seither weltweit verbreitet (Mockenhaupt *et al.* 1997). Die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffs gegen die Malaria ist mittelfristig nicht in Sicht.

1.1.2 Entwicklungszyklus von Plasmodien

Die Malaria wird durch die Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht. Zu den humanpathogenen Plasmodien gehören *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Der Entwicklungszyklus der Parasiten unterteilt sich in einen asexuellen Zyklus (Gewebsschizogonie) im Menschen und in einen sexuellen Zyklus (Sporogonie) in der Anophelesmücke. Bei der Infektion gelangen mit dem Stich einer weiblichen *Anopheles* infektiöse Parasitenformen, die Sporozoiten, aus den Speicheldrüsen der Mücke in den Blutkreislauf des Menschen. Die Sporozoiten befallen innerhalb kürzester Zeit Leberparenchymzellen. In den Hepatozyten findet eine erste asexuelle Teilung statt (Gewebsschizogonie). Diese endet mit der Freisetzung von Merozoiten. Die Dauer dieser Präpatenzzeit ist speziesabhängig und liegt durchschnittlich bei 6 bis 16 Tagen. Die freigesetzten Merozoiten befallen Erythrozyten, womit die erythrozytäre Schizogonie beginnt. Bei Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* können Plasmodien in latenter Form in den Leberzellen verbleiben (Hypnozoiten). Es ist möglich, dass diese erst mehrere Monate oder Jahre später in das erythrozytäre Stadium eintreten. In den Erythrozyten durchlaufen die Parasiten einen Reifungsprozess von der Ringform über den Trophozoiten zum Schizonten. Nach Abschluss der Schizogonie kommt es zur Lyse des Erythrozyten und Freisetzung von Merozoiten, die ihrerseits weitere Erythrozyten befallen. Einige Merozoiten reifen zu Geschlechtsformen (Gametozyten). Werden diese von einer *Anopheles* bei einer Blutmahlzeit aufgenommen, vollzieht sich im Verdauungstrakt der Mücke der geschlechtliche Fortpflanzungszyklus (Sporogonie). An dessen Ende steht die Ausbildung infektiöser Sporozoiten in den Speicheldrüsen der Anopheles-Mücke. Damit ist der parasitäre Entwicklungszyklus abgeschlossen (Lang *et al.* 2000)

1.1.3 Klinik der Malaria tropica

Die Malaria tropica wird durch die Infektion mit *P. falciparum* verursacht. Den „benignen“ Malariaformen, Malaria tertiana und quartana, liegen Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* und mit *P. malariae* zugrunde. In der Regel treten schwere Verläufe mit Beteiligung unterschiedlicher Organsysteme und Todesfälle nur bei der Malaria tropica auf. Betroffen sind insbesondere Patienten, die keine Immunität gegen *P. falciparum* besitzen. In Endemiegebieten stellen neben Kleinkindern schwangere Frauen und insbesondere Erstgebärende eine hervorzuhebende Risikogruppe für einen schweren klinischen Verlauf der Erkrankung dar (McGregor 1984; Shulman *et al.* 2001). Die akute Malaria verläuft nach einer Inkubationszeit von ca. 7-14 Tagen initial uncharakteristisch. Sie beginnt mit einer grippeähnlichen

Allgemeinsymptomatik. Die Patienten entwickeln im Verlauf regelhaft Fieber. Die Malariaanfälle (Wechselfieber) dauern ca. 8-12 Stunden, wobei eine Periodizität insbesondere zu Beginn der Erkrankung eher die Ausnahme darstellt. Die Anfälle sind neben dem ausgeprägten Fieberanstieg durch Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen gekennzeichnet. Pathophysiologische Ursache dieser Symptomatik ist vor allem die Freisetzung endogener Pyrogene bei der Hämolyse infizierter Erythrozyten. Es kommt im Verlauf der Erkrankung zu einer Anämie, Thrombozytopenie und Hepatosplenomegalie, letztere kann jedoch bei akuter Ersterkrankung auch fehlen (Strickland *et al.* 1988; Lang *et al.* 2000). Eine unkomplizierte Malaria kann sich bei Sequestrierung parasitär befallener Erythrozyten im Kapillarbett innerer Organe rasch zum Vollbild einer „schweren und komplizierten Malaria“ entwickeln (Lang *et al.* 2000; WHO 2000). Diese geht mit lebensbedrohlichen Komplikationen einher. Im Vordergrund steht hierbei die zerebrale Malaria. Sie verursacht ca. 80% der Todesfälle (WHO 1985). Störungen des Bewusstseins bis hin zu Koma sind charakteristisch für das Vorliegen dieser Form der Malaria. Nur der Nachweis einer Parasitämie und der Ausschluss anderer Ursachen einer Bewusstseinsstörung (z.B. Meningitis) führen hier zur Diagnose. Der Liquorbefund sowie andere neurologische Befunde sind wenig charakteristisch (Lang *et al.* 2000; WHO 2000).

Häufig sind bei der komplizierten Malaria zusätzlich oder unabhängig von der zerebralen Malaria auch andere Organsysteme betroffen. Ebenfalls mit einer hohen Mortalität einhergehende Komplikationen sind Nieren-, Lungen- und Herz-Kreislaufversagen sowie Störungen der Blutgerinnung (Gilles 1991). Die schwere Malaria kann mit metabolischen Entgleisungen wie Azidose und Hypoglykämie einhergehen. Es werden Hyperpyrexie ($> 40^{\circ}\text{C}$), Hyperparasitämie ($> 5\%$ Parasitendichte), schwere Anämie ($\text{Hb} < 5 \text{ g/dl}$), Hämoglobinurie sowie Dehydratation beobachtet. Die Letalität der unbehandelten schweren Malaria beträgt bei Nichtimmunen ca. 10-20% (Gilles 1991; Lang *et al.* 2000).

In Endemiegebieten verlaufen bei älteren Kindern und Erwachsenen Infektionen mit *P. falciparum* allerdings sehr häufig chronisch. Diese chronischen Infektionen sind häufig oligo- oder asymptomatisch (Ademowo *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1998; May *et al.* 1999). Regelmäßig werden lediglich eine leichte Anämie und Splenomegalie beobachtet (Gilles 1991; Bottius *et al.* 1996; May *et al.* 1999; Lang *et al.* 2000).

1.2 Immunität gegen Malaria

Die Morbidität und Mortalität der Infektion mit *P. falciparum* sind beim Menschen abhängig von seinem Immunstatus, seiner genetischen Disposition, der Stärke der Transmissionsrate sowie der Virulenz des Erregers.

Humangenetische Faktoren, wie verschiedene Hämoglobinopathien (Sichelzellanämie, Thalassämie, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Mangel), wurden als solche, die vor einem schweren Verlauf der Malaria schützen, identifiziert (Miller 1994). Träger bestimmter Oberflächenantigene (HLA BW53, DRI1303), wie sie bei einzelnen ethnischen Gruppen auftreten, scheinen ebenfalls seltener an einer schweren Malaria zu erkranken (Hill *et al.* 1991).

1.2.1 Teilimmunität

Eine expositionsabhängige Immunität gegen die Malaria wurde schon mit Entdeckung des parasitären Kreislaufs beobachtet. Ross definierte diese Immunität als die Abwesenheit klinischer Symptome bei Anwesenheit niedriger Parasitämie (Ross 1910).

Über mehrere Jahre hinweg entwickelt sich bei Infizierten in Endemiegebieten eine körpereigene Immunabwehr gegen die Erkrankung. Zur Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Teilimmunität ist eine kontinuierliche Erregerexposition notwendig (Smith *et al.* 1999; Tanner *et al.* 1999).

Von dieser Form der Immunität ist der Schutz neugeborener Kinder zu trennen. Neugeborene erkranken während der ersten Lebensmonate selten an einer Malaria (Brabin *et al.* 1990). Hierfür verantwortlich sind der erhöhte Anteil an fetalem Hämoglobin (Pasvol *et al.* 1976), der geringe Gehalt an para-Aminobenzoe-Säure (PABA) in der Muttermilch (Jacobs 1964) und die von der Mutter auf das Kind übertragenen malariaspezifischen Antikörper (Carlier *et al.* 1995). Dieser Schutz verliert sich zunehmend im Laufe des ersten Lebenshalbjahres.

In endemischen Gebieten nimmt die Inzidenz der klinischen Malaria ab dem dritten Lebensmonat zu. Im Alter von sechs Monaten werden bei Säuglingen höchste Parasitendichten und häufige fieberhafte Erkrankungen beobachtet (Kitua *et al.* 1996). Die malariabedingte Sterblichkeit erreicht in Hochendemiegebieten im zweiten Lebensjahr ihr Maximum (Smith *et al.* 1999). Mit zunehmendem Alter nehmen die Parasitendichten und die Inzidenz der klinischen Malaria in Endemiegebieten langsam ab, die Prävalenz einer *P.-falciparum*-Infektion bleibt aber bis ins Erwachsenenalter hoch (Petersen *et al.* 1991). Bis zum Erwachsenenalter entwickelt sich in den Endemiegebieten diese potente klinische Immunität, die vor der Erkrankung, nicht jedoch vor der Infektion schützt (Rogier *et al.* 1996). Diese führt im Erwachsenenalter zu einer dauerhaft niedrigen Parasitämie, nicht aber zur vollen Eradikation des Erregers (Trape *et al.* 1994). Bei schwangeren Frauen ist diese Immunität jedoch ineffektiv (McGregor *et al.* 1984; Fievet *et al.* 1997).

Bis heute sind die Abläufe, die zur Ausbildung der Immunität führen, nicht vollständig geklärt. Die intrazelluläre Lokalisation der Parasiten während fast des gesamten parasitären Lebenszyklus, erschwert die Abwehr für den Wirt. Bei der Immunantwort kommen sowohl

humorale als auch zelluläre Abwehrmechanismen zum Tragen. Zu Beginn der Infektion werden CD4+T-Zellen aktiviert. Diese differenzieren zu Th-1-Zellen, es werden Zytokine vom Typ1 (TNF- α , IL-2 und INF- γ) gebildet. Diese stimulieren die zelluläre Abwehr. In der Milz werden infizierte Erythrozyten sowie präerythrozytäre Plasmodienformen von γ dT-Zellen aus dem Blutkreislauf eliminiert (McKenna *et al.* 2000). Im weiteren Verlauf der Infektion differenzieren B-Zell-vermittelt die CD4+T-Zellen zu Th2-Zellen, produzieren Zytokine vom Typ2, wie IL-4, IL-5 und IL-10, und es kommt zur verstärkten Bildung von Antikörpern. Diese Antikörper wirken möglicherweise über eine Inhibition der Merozoiteninvasion, eine Opsonierung befallener Erythrozyten und die verstärkte Phagozytose. Es wurden Antikörper gegen verschiedene parasitäre Oberflächenantigene nachgewiesen. Zu diesen Antigenen gehören auch die Merozoiten Oberflächen Proteine (MSP-1 und MSP-2 [engl. *Merozoite-Surface-Protein*]) deren Gene in dieser Untersuchung typisiert werden (al-Yaman *et al.* 1997; Holder *et al.* 1999), sowie das *P.-falciparum*-Erythrocyten-Membran-Protein-1 (PfEMP-1) [engl. *P.-falciparum*-Erythrocyte-Membrane-Protein]), ein Protein, das auf der Oberfläche befallener Erythrozyten exprimiert wird (Beeson *et al.* 2000).

1.2.2 Prämunition durch chronische Infektion mit *P. falciparum*

Sergent und Parrot (1935) prägten erstmals den Begriff der Prämunition und definierten diese als Schutz vor Superinfektionen mit *P. falciparum* durch eine bereits vorhandene oder persistierende Infektion (Tanner *et al.* 1999). Seit erkannt wurde, dass *P. falciparum* eine ausgeprägte genetische Diversität besitzt und an den häufigen chronischen Infektionen in Endemiegebieten in der Regel multiple Stämme von *P. falciparum* beteiligt sind, wurde der Begriff der Prämunition modifiziert. Smith *et al.* (1999) stellten fest, dass die Manifestation einer Neu-Infektion mit *P. falciparum* vom Bestehen einer teilweise kreuzreaktiven Immunität gegen vorhandene oder persistierende Parasiten beeinflusst wird. Sie sind der Auffassung, dass neu erworbene Parasitenstämme durch Immunmechanismen, die durch persistierende Infektionen induziert und aufrecht erhalten werden, kontrolliert werden. Die neu erworbenen Parasitenstämme werden so in ihrer Multiplikation gehemmt. Das Ausmaß der antiparasitären Kontrolle korreliert dabei mit der Antigenverwandtschaft zwischen neu erworbenen und persistierenden Parasitenstämmen. Eine klinische Manifestation der Malaria wird so verhindert, eine kontinuierliche niedrige Parasitämie bleibt aber erhalten.

Das Fehlen der Prämunition im Kleinkindalter scheint eine der Hauptursachen für schwere Verläufe der Erkrankung zu sein. Kleinkinder, die gerade ihren mütterlichen Immunschutz verloren haben, besitzen noch nicht die Fähigkeit, die notwendigen niedrigen Parasitämien zu tolerieren und somit die Infektion zu kontrollieren. Sie sind extrem anfällig für eine klinische

Malaria (Smith *et al.* 1999; Tanner *et al.* 1999; Soe *et al.* 2001). Die Abbildung 1 zeigt modellhaft die Entwicklung einer Prämunition, abhängig vom Alter.

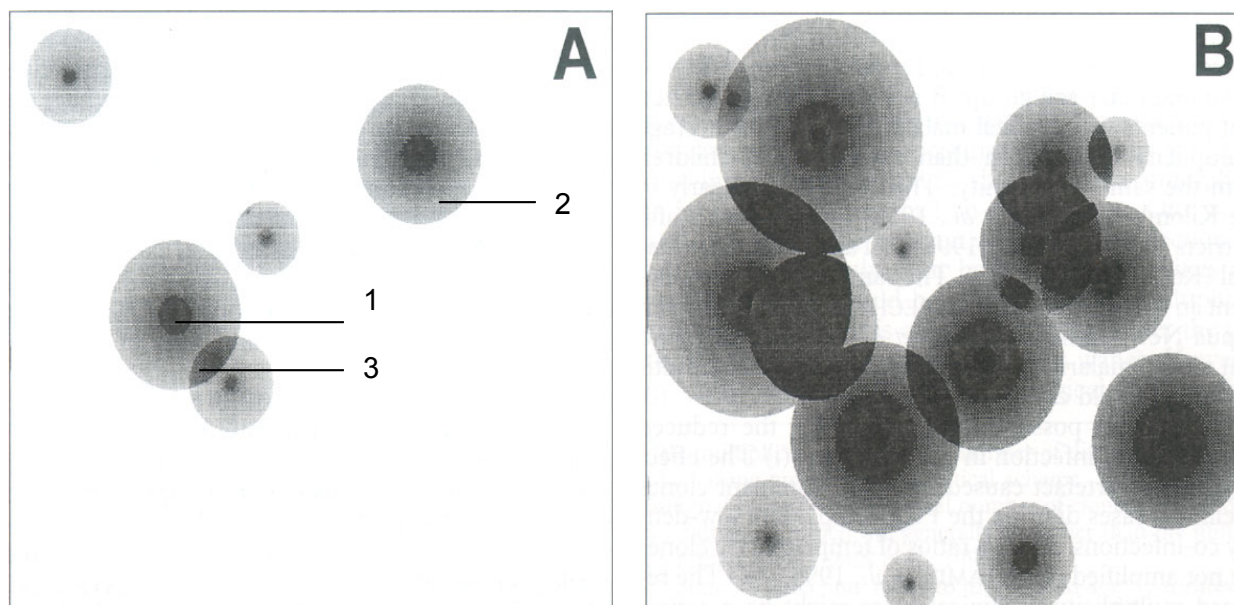


Abbildung 1: Entwicklung einer Immunität und Prämunition (Smith *et al.* 1999)

Immunantworten, Schematische Darstellung des Prämunitionsmodells: **A**: Kleinkinder mit einem Alter von ca. 0,5 bis 2 Jahren; nur wenige kreuzreaktive Immunmechanismen; **B**: ältere Kinder und Erwachsene; eine Vielzahl kreuzreaktiver Immunmechanismen.

- 1) im Zentrum: stammspezifische Immunantwort
- 2) Peripherie: kreuzreaktive Immunantwort
- 3) Beispiel: „überschneidende“ Immunantworten

1.3 Genetische Diversität von *P. falciparum*

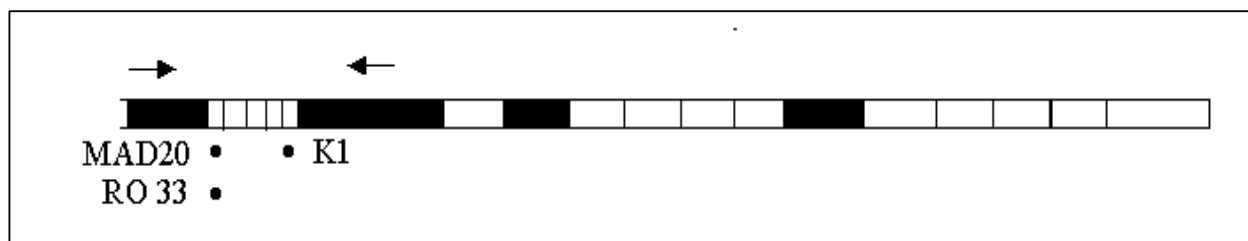
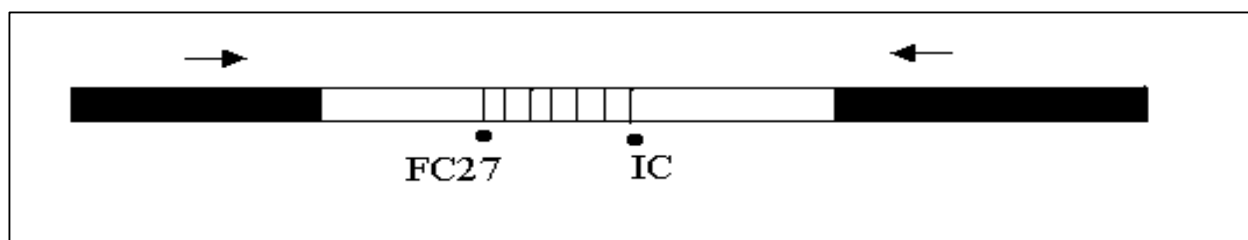
Spezifische Oberflächenproteine von *P. falciparum* (z.B. MSP-1, MSP-2) besitzen eine hohe Diversität. Einige dieser Proteine scheinen eine Bedeutung bei der zuvor beschriebenen Entwicklung einer körpereigenen Immunität zu haben. Andere werden als parasitäre Virulenzfaktoren angesehen (Meyer *et al.* 2002). Die Entwicklung eines Impfstoffs gegen *P. falciparum* scheiterte bis heute primär am Polymorphismus dieser Antigene (Greenwood 2002). Die hohe Diversität der parasitären Antigenstrukturen spiegelt sich in einer ausgeprägten genetischen Diversität wider. Neben den Genen die für die Merozoiten-Oberflächen-Proteine 1 und 2 (*msp-1*, *msp-2*) kodieren, ließen sich unter anderem folgende Gene bzw. Genfamilien mit einer hohen Diversität typisieren: *var*-Genfamilie (Smith *et al.* 1995), *histidine-rich-protein 1* (Polge *et al.* 1988), *glutamate-rich-protein* (Borre *et al.* 1991), *ring-infected-erythrocyte-surface-antigen* (Favaloro *et al.* 1986), *Pf60* (Carcy *et al.* 1994).

Msp-1 und *msp-2*, die in dieser Arbeit typisiert werden, sind schematisch in Abbildung 2 und 3 dargestellt. Das für *msp-1* kodierende Gen wurde auf Chromosom 9 lokalisiert (Tanabe *et al.*

1987). Tanabe *et al.* (1997) kategorisierten dieses Gen in 17 Blöcke, wobei Block 2 aufgrund seines Polymorphismus' von Interesse für die Genotypisierung ist. Das für *msp-2* kodierende Gen wurde auf Chromosom 7 lokalisiert (Smythe *et al.* 1990). Beide Gene besitzen hoch polymorphe Regionen, die von stabilen bzw. semistabilen Regionen flankiert werden. Die polymorphen Regionen unterscheiden sich in ihrer Nucleotidsequenz und in der Anzahl der Sequenzwiederholungen. Entsprechend der Nucleotidsequenz werden K1, Mad 20 und Ro 33 als Allelfamilien von *msp-1* und FC 27 und IC als Allelfamilien des *msp-2* beschrieben. Durch die Sequenzwiederholungen und Längenpolymorphismen der Allelfamilien können, abhängig von der Basenpaarlänge, eine Vielzahl einzelner Allele voneinander abgegrenzt werden. In verschiedenen epidemiologischen Studien konnten so bis zu 30 verschiedene Allele von *msp-1* und 47 unterschiedliche Allele von *msp-2* nachgewiesen werden (Robert *et al.* 1996; Konate *et al.* 1999; Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001). Da die Chromosomen der asexuellen Stadien von *P. falciparum* im Menschen als haploid vorliegen, kann durch den Nachweis verschiedener Allele eine Infektion mit verschiedenen Genotypen von *P. falciparum* erkannt werden. Folglich kann auf die Multiplizität der Infektion geschlossen werden. Aufgrund der ausgeprägten Diversität von *msp-1* und *msp-2* wurden diese Gene in epidemiologischen Studien verschiedenster Endemiegebiete zur Bestimmung der Diversität dort vorkommender Stämme von *P. falciparum* und zur Bestimmung der Multiplizität der Infektion typisiert. *Msp-1* und *msp-2* gelten derzeit als aussagekräftige Marker zur Genotypisierung (Robert *et al.* 1996; Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001).

Die Diversität der Erreger ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So wird eine Abhängigkeit von der Transmission von *P. falciparum* beschrieben. In Gebieten mit niedrigen Infektionsraten wurde eine niedrige Diversität der Erreger beschrieben (Babiker *et al.* 1995; Haddad *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu wurde eine hohe genetische Diversität des *P. falciparum* in Hochendemiegebieten nachgewiesen (Robert *et al.* 1996; Felger *et al.* 1999). Die Verbreitung verschiedener Allele scheint geographisch unterschiedlich zu sein. So wurden verschiedene Genotypen in verschiedenen Endemiegebieten nachgewiesen (Creasey *et al.* 1990).

Die Hypothese, dass bestimmte Genotypen bzw. bestimmte Stämme von *P. falciparum* eine größere Virulenz als andere besitzen, ist seit langem Inhalt wissenschaftlicher Diskussionen, bleibt aber bis heute größtenteils ungeklärt (James *et al.* 1932; Gupta *et al.* 1994). Einige Arbeiten zeigten, dass bestimmte Stämme von *P. falciparum* mit einer erhöhten Morbidität einhergehen (Carlson *et al.* 1990; Engelbrecht *et al.* 1995; Rowe *et al.* 1995; Ariei *et al.* 2001; Ofosu-Okyere *et al.* 2001). Zudem gibt es Anhalt dafür, dass spezifische Genotypen gehäuft bei Schwangeren auftreten (Schleiermacher *et al.* 2001).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des *msp-1*-Gens (Block 2)Abbildung 3: Schematische Darstellung des *msp-2*-Gens

Schematische Darstellung der Gene, die für die Merozoiten-Oberflächen-Proteine kodieren (engl. *merozoite surface protein*). Stabile und semistabile Regionen sind als weiße und schwarze Einheiten, polymorphe Regionen sind als vertikal gestreifte Einheiten dargestellt, Pfeile bezeichnen die Ansatzpunkte der Primer einer PCR.

1.4 Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum*

Infektionen von *P. falciparum* sind bei Einwohnern von Endemiegebieten sehr häufig polyklonal, d.h. an diesen Infektionen sind in der Regel mehrere Stämme von *P. falciparum* beteiligt (Babiker *et al.* 1999; Färnert *et al.* 1999; Felger *et al.* 1999). Die Prävalenz einer multiplen Infektion von *P. falciparum* lag in Hochendemiegebieten in Tansania bei 85% (Smith *et al.* 1993; Hill *et al.* 1995), in Senegal bei 82% (Trape *et al.* 1994; Ntoumi *et al.* 1995). Bis zu acht verschiedene Parasitenstämme konnten pro Isolat in diesen Gebieten typisiert werden. Es wurden verschiedene Faktoren beschrieben, die die Multiplizität der Infektion beeinflussten. So wurden Zusammenhänge zwischen der Endemizität (Babiker *et al.* 1999), den Parasitendichten der Infektionen (Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001), der Einnahme von antiparasitären Medikamenten (Beck *et al.* 2001) und dem Alter der Patienten beobachtet (Smith *et al.* 1999). Einige Arbeiten zeigen eine Assoziation der Multiplizität der Infektion mit einer klinischen Manifestation der Malaria (Felger *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001; Ofosu-Okyere *et al.* 2001). In verschiedenen Studien bei Kindern gibt es Anhalt dafür, dass polyklonale Infektionen eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung einer natürlichen Immunität haben (Contamin *et al.* 1995; al-Yaman *et al.* 1997; Färnert *et al.* 1999). So steigt die Multiplizität der Infektion in den ersten Lebensjahren, erreicht ihren Höhepunkt mit ca. 3 bis 6

Jahren und fällt danach wieder ab (Ntoumi *et al.* 1995; Smith *et al.* 1999). Das Alter und die Höhe der Übertragungsrate von *P. falciparum* scheinen hierbei eine sehr wichtige Bedeutung zu haben. Es wurde nachgewiesen, dass eine hohe Multiplizität der Infektion in Gebieten mit hoher Transmission bei Kindern bis zu einem Alter von 2 Jahren mit einer klinischen Manifestation assoziiert war. Dagegen zeigten sich bei älteren Kindern, die eine hohe Multiplizität der Infektion aufwiesen, im Vergleich zu Kindern mit einer niedrigen Multiplizität der Infektion seltener klinische Manifestationen (Contamin *et al.* 1995; al-Yaman *et al.* 1997; Beck *et al.* 1997; Färnert *et al.* 1999). Diese gegensätzliche Assoziation der Multiplizität der Infektion und der klinischen Manifestation der Erkrankung bei Kleinkindern und älteren Kindern bzw. Erwachsenen reflektiert möglicherweise verschiedene Stufen der Entwicklung einer körpereigenen Immunität (Smith *et al.* 1999). Wiederholte und oft lang andauernde chronische Infektionen mit verschiedenen Stämmen des *P. falciparum* führen mit zunehmendem Alter zu einer Entwicklung, Aufrechterhaltung und Erweiterung der stammspezifischen Immunität. Diese These würde auch das zuvor von Smith *et al.* (1999) geprägte Prämunitionsmodell erklären. Zu diskutieren wäre, ob dieses Modell auf schwangere Frauen übertragen werden kann.

1.5 Malaria in der Schwangerschaft

In endemischen Gebieten haben neben Kleinkindern ebenfalls schwangere Frauen ein erhöhtes Risiko an einer symptomatischen Malaria zu erkranken. Insbesondere sind davon Erstgebärende betroffen (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Shulman *et al.* 2001). Die Prävalenz der *P. falciparum*-Infektion ist bei Schwangeren in Gebieten südlich der Sahara hoch. Bei Untersuchungen in Kenia wurde bei 64% der untersuchten schwangeren Frauen eine Infektion mit *P. falciparum* beobachtet (Shulman *et al.* 2001). In Ghana, im Untersuchungsgebiet der vorliegenden Arbeit wurde bei 63% der untersuchten Schwangeren eine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen (Mockenhaupt *et al.* 2000). Häufiger als bei Nichtschwangeren geht die Malaria bei Schwangeren mit Komplikationen und schweren Verläufen einher. Diese betreffen sowohl die Mutter, als auch den Fetus (Ordi *et al.* 1998; Sullivan *et al.* 1999). In Mosambik waren zum Beispiel ca. 20% aller mütterlichen Todesfälle unmittelbar auf eine Malaria zurückzuführen (Granja *et al.* 1998). Die Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft geht zudem regelmäßig mit einer mütterlichen Anämie und einer plazentaren Infektion einher (Matteelli *et al.* 1997; Mockenhaupt *et al.* 2000; Shulman *et al.* 2001). Die Infektion der Plazenta führt, bedingt durch eine chronische Intervillositis, zu pathologischen Gewebsveränderungen (Bulmer *et al.* 1993; Matteelli *et al.* 1997). Diese erhöhen durch Gas- und Nährstofftransportstörungen das Risiko fetaler Komplikationen, wie zum Beispiel einer intrauterinen Wachstumsstörung (Menendez *et al.* 2000). Somit kommt es

bei Kindern von mit *P. falciparum* infizierten Müttern gehäuft zu einem verminderten Geburtsgewicht (Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000). Eine Infektion mit *P. falciparum* erhöht zudem das Risiko einer kindlichen Frühgeburt und einer damit einhergehenden peri- und neonatalen Sterblichkeit (Kulmala *et al.* 2000). Auch im Tierversuch wurde eine erhöhte Abortrate sowie Säuglingssterblichkeit bei schwangeren Rhesusaffen, die mit *P. falciparum* infiziert waren, nachgewiesen (Davison *et al.* 1998). Neugeborene von Müttern, die mit *P. falciparum* infiziert sind, leiden häufig an einer neonatalen Anämie (Reed *et al.* 1994). Im frühen Kindesalter wird bei diesen Kindern gehäuft eine schwere klinische Malaria sowie eine Anämie beobachtet (Cornet *et al.* 1998).

Bei wiederholten Schwangerschaften vermindert sich das Risiko einer klinischen Manifestation der Malaria. Ebenso sinkt die Prävalenz der *P.-falciparum*-Infektion mit steigender Parität (Fleming 1989; Shulman *et al.* 2001). Verschiedene Ansätze versuchen, die erhöhte Erkrankungsrate schwangerer Frauen und besonders Erstgebärender zu erklären.

Einerseits tritt bei Schwangeren eine physiologische Immunmodulation auf, die eine Abstoßung des immunologisch fremden Fetus verhindert. Dieser Prozess wird durch einen Cortisolanstieg vermittelt (Vleugels *et al.* 1989). Dabei wird vor allem die zellvermittelte Immunität supprimiert (Riley *et al.* 1989; Fievet *et al.* 2001). Es kommt in der Plazenta zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen des Typs Th1, vor allem IL-10, und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der humoralen Immunantwort (Vince *et al.* 1996; Bates *et al.* 2002). Die bei der zellulären Abwehr vom Typ Th2 gebildeten Zytokine TNF- α und IFN- γ führten *in vitro* zu Alterationen und Zerstörung von Trophoblasten und zu einer verminderten Produktion von GM-CSF, der ein wichtiger Faktor für das Wachstum des Feten ist (Deloron *et al.* 1995).

Außerdem ist aufgrund der gesteigerten *Erythropoese* während der Schwangerschaft der Anteil an jungen Erythrozyten erhöht. Diese bieten optimale Multiplikationsbedingungen für den Parasiten (Tian *et al.* 1998; Fievet *et al.* 2001).

Lindsay *et al.* wiesen nach, dass schwangere Frauen doppelt so häufig von infektiösen Anophelesmücken gestochen werden wie ihre nichtschwangeren Altersgenossinnen (Lindsay *et al.* 2000). Physiologische schwangerschaftsspezifische Veränderungen, wie Anstieg des Blutglukosespiegels, aber auch veränderte Verhaltensmuster Schwangerer werden für den Attraktivitätsanstieg schwangerer Frauen für infizierte Anophelesmücken verantwortlich gemacht.

Andererseits wurde gezeigt, dass spezielle Subpopulationen von *P. falciparum* in der Plazenta der Infizierten sequestrieren und die typische plazentare Malaria hervorrufen. Die Parasiten entgehen so dem Immunsystem und der Elimination in der Milz. Die Sequestration der mit diesen Parasiten infizierten Erythrozyten wird über Liganden, die an der Oberfläche der

infizierten Erythrozyten exprimiert werden, vermittelt. Diese Liganden richten sich gegen plazentare Glycosaminoglykane, vor allem Chondroitin-Sulfat-A (CSA) und Hyaluronsäure (HA). Die Oberflächenproteine *PfEMP-1* (Plasmodium-falciparum-Erythrozyten-Membran-Protein-1), welche durch die polymorphe *var*-Gengruppe der Plasmodien kodiert werden, spielen bei der Adhäsion an das plazentare Chondroitin-Sulfat-A (CSA) eine Schlüsselrolle (Reeder *et al.* 1999; Scherf *et al.* 2001). Die bei Schwangeren nachgewiesenen *P.-falciparum*-Stämme exprimieren besondere Varianten des *var*-codierten *PfEMP-1*, wodurch es zu einem Affinitätswechsel vom Hauptliganden CD-36 zum Chondroitin-Sulfat-A kommt (Beeson *et al.* 2001) (siehe Abbildung 4).

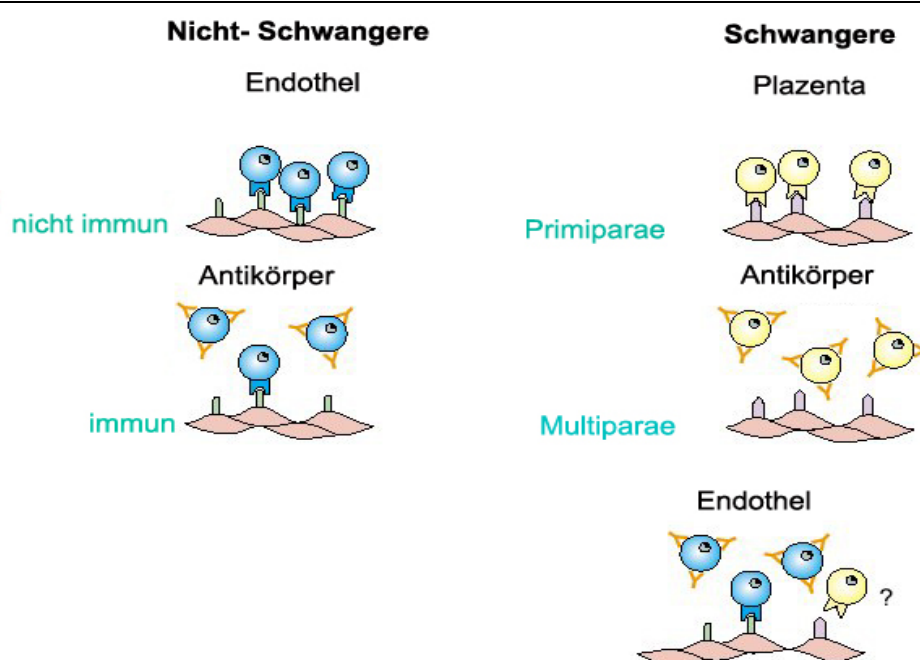


Abbildung 4: Antigenvariationen von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten

Mögliche Bedeutung von Antigenvariationen und Wirt-Zell-Adhäsionen von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten: Nichtimmune Individuen, die von Parasitenpopulationen, die an das Endothel verschiedener innerer Organe über Rezeptoren, wie CD36 und ICAM-1 (grün) binden. Immune Individuen bilden eine Vielzahl von Variantenspezifischen Antikörpern, die protektive Eigenschaften besitzen und eine Adhäsion an Endothelzellen verhindern. Bei Primiparae (vergleichbar mit „nicht immun“) kommt es zu Infektionen mit Subpopulationen mit anderen Antigenstrukturen (gelb), die an schwangerschaftsspezifische Rezeptoren wie Chondroitinsulfat-A (CSA) oder Hyaluronsäure in der Plazenta (lila) binden. Multiparae (vergleichbar mit „Immunität“) sind weniger anfällig für eine Infektion mit schwangerschaftsspezifischen Parasiten durch einen anitadhäsiven Schutz. Es ist unklar, ob schwangerschaftsspezifische Parasiten in anderen inneren Organen wie der Plazenta sequestrieren (Beeson *et al.* 2001).

Da CSA fast ausschließlich in der Schwangerschaft exprimiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Infektion mit CSA-bindenden Parasiten bei Nichtschwangeren etabliert, eher gering. Da sich die Oberflächenstrukturen dieser schwangerschaftsspezifischen Parasiten von denen anderer unterscheiden, ist die Entwicklung spezifischer Immunmechanismen gegen diese plazentaadhärierende *P.-falciparum*-Stämme bei Nichtschwangeren unwahrscheinlich (Beeson *et al.* 2001). Folglich findet in der ersten Schwangerschaft die primäre Auseinandersetzung des Immunsystems mit diesen bislang unbekannten Parasitenstämmen statt. Mit zunehmender Anzahl der Schwangerschaften erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass das Immunsystem bereits mit derartigen Subpopulationen bekannt ist (Ricke *et al.* 2000). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass Erstgebärende am stärksten durch eine *Malaria tropica* gefährdet sind und das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der Schwangerschaften fällt. Diese These wird von einer Untersuchung in Kamerun gestützt. Bei *In-vitro*-Experimenten gelang es, mit Seren von Mehrfachgebärenden die Adhäsion von *P. falciparum* an Chondroitin-Sulfat-A (CSA) zu hemmen. Dies war mit Seren von Erstgebärenden nicht möglich (Maubert *et al.* 1999). Der Einfluss polyklonaler Infektionen auf die Morbidität schwangerer Frauen wird in den bis heute wenigen veröffentlichten Arbeiten kontrovers diskutiert und bleibt letztendlich unverstanden (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Bei Infektionen schwangerer Frauen scheint aber im Vergleich zu Nichtschwangeren eine erhöhte Anzahl an genetisch unterschiedlichen Stämmen beteiligt zu sein (Schleiermacher *et al.* 2001). In einer früheren Studie in Ghana, die im gleichen Untersuchungsgebiet wie das der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, konnte eine Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion von der Parität nachgewiesen werden (Beck *et al.* 2001). Diese Abhängigkeit konnte in Mosambik und in Senegal nicht eindeutig gezeigt werden (Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). In Ghana war die Multiplizität der Infektion bei Schwangeren mit einer Anämie assoziiert (Beck *et al.* 2001), welche in Senegal und in Mosambik ebenfalls nicht bestätigt werden konnte (Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Einen Einfluss der Multiplizität auf eine fetale Entwicklungsstörung oder eine erhöhte Frühgeburtsrate wurde bis jetzt nicht nachgewiesen.

1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

In Endemiegebieten stellt die Malaria in der Schwangerschaft ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Verschiedene Studien in Endemiegebieten bei Kindern und Erwachsenen haben gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Multiplizität der Infektion und der klinischen Manifestation der Malaria gibt. Es wird diskutiert, dass Infektionen mit mehreren Genotypen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Abwehrmechanismen und

einer Immunität spielen. Beschrieben wurde auch, dass bestimmte Stämme von *P. falciparum* mit einer schweren klinischen Manifestation der Malaria tropica assoziiert sind. Nur wenig ist über die Häufigkeit und Bedeutung polyklonaler Infektionen von *P. falciparum* in der Schwangerschaft bekannt. Die wenigen hierzu veröffentlichten Arbeiten sind widersprüchlich (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Vergleichende Untersuchungen der Parasitenpopulation in plazentar und peripher gewonnenem Blut liegen bis heute kaum vor und sind ebenfalls widersprüchlich (Kamwendo *et al.* 2002; Kassberger *et al.* 2002; Schleiermacher *et al.* 2002).

In einer Querschnittsstudie im holoendemischen Malariagebiet von Agogo (Ghana) soll mittels PCR-Genotypisierung die Prävalenz spezieller Genotypen von *P. falciparum* sowie die Multiplizität der Infektion bei Schwangeren untersucht werden. Diese Untersuchung erfolgt durch den Nachweis und die Typisierung von *msp-1* und *msp-2*.

Für die vorliegende Arbeit sind folgenden Fragen von speziellem Interesse:

1. Entsprechen die Genotypen, die in einer peripheren Untersuchungsprobe nachgewiesen werden, denen, die in der plazentaren Untersuchungsprobe nachweisbar sind? Kann also eine Genotypisierung von *P. falciparum* aus einem peripher gewonnenen Isolat das Gesamtbild einer Infektion mit *P. falciparum* bei Schwangeren darstellen?
2. Gibt es einzelne Stämme (Genotypen) von *P. falciparum*, die im Vergleich zur peripheren Untersuchungsprobe häufiger in plazentaren Untersuchungsproben auftreten und hierdurch einen Anhalt für schwangerschaftsspezifische Virulenzfaktoren geben, die eine plazentare Sequestration des Parasiten zur Folge haben?
3. Wie häufig sind polyklonale Infektionen mit *P. falciparum*? Wie hoch ist die durchschnittliche Anzahl von Genotypen im Untersuchungsgebiet (Multiplizität der Infektion)? Gibt es bei Schwangeren einen Zusammenhang zwischen der Multiplizität der Infektion eines peripher gewonnenen Isolats und der Multiplizität der Infektion eines plazentar gewonnenen Isolats ?
4. Welchen Einfluss haben Faktoren wie Wohnort, Alter, Parität, plazentare Parasitendichten sowie Saison und die Einnahme von antiparasitären Medikamenten auf die plazentare Infektion mit bestimmten Genotypen von *P. falciparum* und die Multiplizität der Infektion?
5. Ist eine Infektion mit bestimmten Genotypen sowie das Ausmaß der Multiplizität der Infektion mit klinischen Manifestationsformen der Malaria, wie einer Anämie, einer Frühgeburtlichkeit, oder einem vermindertem Geburtsgewicht vergesellschaftet? Bestehen Unterschiede in Bezug auf diese Frage zwischen Primi- und Multiparae?

2 Patientinnen, Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Querschnittsuntersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperationsstudie des Department of Medicine, School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana und dem Institut für Tropenmedizin Berlin am Presbyterian Mission Hospital Agogo, Ghana durchgeführt. Das Projekt wurde vom Committee on Human Research, Publication and Ethics der School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana begutachtet und zur Durchführung freigegeben. Klinische, parasitologische und hämatologische Untersuchungen erfolgten in Agogo. Die Aufbereitung der in Agogo gewonnen Blutproben, wie DNA-Extraktion sowie die molekularbiologischen Untersuchungen wurden am Institut für Tropenmedizin in Berlin durchgeführt. Pharmakologische Untersuchungen, wie die Bestimmungen der Plasmakonzentrationen von Chloroquin und Pyrimethamin, erfolgten in Amsterdam (Department of Clinical Pharmacology, Academic Medical Centre, University of Amsterdam).

2.1 Studienort

Das Studiengebiet von Agogo liegt östlich der Stadt Kumasi in ländlicher Umgebung des Asante Akim North District in Ghana, Westafrika. (Abbildung 5).

Im holoendemischen Untersuchungsgebiet von Agogo ist die Infektionsrate der Malaria ganzjährig hoch. *P. falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, wird hier als vorherrschender Parasit beschrieben, gefolgt von *P. malariae* bzw. *P. ovale*. Die Prävalenz einer Plasmodienparasitämie bei Einwohnern (≥ 2 Jahre) der Ashantiregion beträgt ca. 50%. Die mittlere Parasitendichte bei mit *P. falciparum* infizierten Patienten liegt bei ca. 550 Parasiten je μl (Browne *et al.* 2000). Die Inzidenz einer klinischen Malaria erreicht während und kurz nach den beiden Regenzeiten (Mai-Juli bzw. September-Oktober) ihren Höhepunkt. Am Ende der Trockenzeit d.h. im Februar zeigt die Erkrankungshäufigkeit ihren niedrigsten Wert (Quarterly Health Statistics, Presbyterian Hospital Agogo). Eine 1998 durchgeführte Studie im Einzugsgebiet des Presbyterian Hospital Agogo zeigte eine Prävalenz von 63% einer *P. falciparum*-Infektion bei schwangeren Frauen. Davon hatten 32% der infizierten Frauen eine mikroskopisch nachgewiesene periphere Parasitämie (mittlere Parasitendichte: 304/ μl). 31% der Frauen hatten eine submikroskopische Infektion. *P. falciparum* war auch hier der vorherrschende Parasit. Bei 91% der Infektionen stellte *P. falciparum* die alleinige Parasitenspezies dar. Mit steigender Zahl vorangegangener Schwangerschaften fiel die Prävalenz einer Infektion sowie die Parasitendichten der Infektionen (Mockenhaupt *et al.* 2000).



Abbildung 5: Geographische Darstellung von Ghana und dem Studiengebiet

2.2 Studiengruppe

Vom 24. Januar 2000 bis 24. Januar 2001 wurden 893 gebärende Frauen und ihre neugeborenen Kinder untersucht. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren 474 Patientinnen mit einer *P. falciparum* Infektion der Plazenta. Alle untersuchten Patientinnen stammten aus Agogo oder dem ländlichen Einzugsgebiet des Presbyterian Hospital Agogo und gehörten fast ausschließlich dem Stamm der Akan an.

2.3 Klinische Untersuchungen

Die Anamnese sowie die klinischen Untersuchungen und Blutentnahmen wurden durch das Personal der Abteilung für Geburtshilfe des Presbyterian Hospital Agogo und durch Mitarbeiter des Instituts für Tropenmedizin Berlin durchgeführt. Demographische Daten der Schwangeren wie Alter, Wohnort, Ausbildungsgrad, Parität sowie Daten über die Einnahme von Antimalariamedikamenten wurden erhoben. Die Körpertemperatur wurde axillär gemessen. Die neugeborenen Kinder wurden direkt nach der Geburt zur Prüfung ihrer Vitalität und ihres

Reifezustandes untersucht. Die Vitalitätsprüfung erfolgte nach Apgar 1, 5 und 10 Minuten nach der Geburt. Das Geburtsgewicht, die Körpergröße und der Kopfumfang wurden gemessen. Die Bestimmung des Gestationsalters des Neugeborenen erfolgte nach Finnstrom (1977). Die Geburt eines Kindes mit einem Gestationsalter von weniger als 37 Wochen galt als eine Frühgeburt. Ein Geburtsgewicht von weniger als 2500g galt als ein vermindertes Geburtsgewicht (Finnstrom 1977).

2.4 Gewinnung, Lagerung, Aufbereitung und Transport der Blutproben

Zur Durchführung der verschiedenen Blutuntersuchungen wurde den Gebärenden vor der Geburtseinleitung eine periphere venöse Blutprobe von 8 ml entnommen. Diese Blutentnahme erfolgte aus einer Unterarm- bzw. Kubitalvene. Eine zweite Blutprobe von ca. 2 ml wurde nach Beendigung der Nachgeburtsphase aus der Plazenta durch Inzision in die maternale Seite der Plazenta gewonnen. Es wird davon ausgegangen, dass sich diese plazentare Blutprobe aus einem Gemisch von mütterlichem und kindlichem Blut zusammensetzt. Die Proben wurden sofort in Aliquots aufgeteilt (mit EDTA- Zusatz, ohne Zusatz zur Serumgewinnung). In den folgenden 12 Stunden wurde das Serum durch Zentrifugieren abgetrennt. Für spätere molekularebiologische Untersuchungen wurde ein Teil des EDTA-Blutes DNA-stabilisiert: Das heißt: Nach dem Zentrifugieren wurde das Plasma aus dem Überstand entnommen und verworfen. Im Anschluss erfolgte ein Resuspendieren (90 µl Blutsediment, 90 µl PBS- Puffer [engl. Phosphat buffered saline] und 180 AS- Puffer [Puffer auf der Basis von Guanidiniumhydrochlorid]). Dieses Gemisch wurde in Aliquots gegeben. Alle Proben wurden bis zum Transport nach Berlin bei +4°C, bzw. –20°C (Serum) gelagert. Der Transport von Ghana nach Berlin bzw. Amsterdam erfolgte in Kühlbehältern, dabei wurde die Kühlkette während des Transportes nicht unterbrochen. Teil des Plasmas wurde zur Bestimmung der Konzentrationen von Pyrimethamin und Chloroquin nach Amsterdam ins Academic Medical Centre (Department of Clinical Pharmacology) transportiert.

2.5 Hämatologische Untersuchungen

Sofort nach der Blutabnahme wurde von jeder Blutprobe der Hämoglobingehalt (Hb) mit HemoCue Photometer bestimmt (Angelholm, Schweden, [Schenk *et al.* 1986]). Weitere hämatologische Parameter, wie Erythrozyten- und Leukozytenzahl (EZ und LZ), mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten (MCV), Hämatokrit (Hkt), Hämoglobingehalt (Hb) sowie die mittlere korpuskuläre Hb- Konzentration (MCH), wurden innerhalb von 12 Stunden nach der Blutabnahme mit einem halbautomatischen Zellzählgerät (HC555, Clinicon, Mannheim) bestimmt.

2.6 Mikroskopische Untersuchungen

Von jeder Blutprobe wurden „Dicke Tropfen“ zur Bestimmung der Parasitämie und Blutausstriche zur Speziesdifferenzierung angefertigt. Bei eintausendfacher Vergrößerung wurden die Präparate mit dem Ölimmersionsobjektiv im Lichtmikroskop (Zeiss) beurteilt. Zur Auswertung der „Dicken Tropfen“ wurde die Zahl asexueller Parasiten pro 500 Leukozyten bestimmt. Die Parasitämie (Parasiten pro Mikroliter Blut) errechnet sich auf der Basis der Leukozytenzahl pro Mikroliter Blut. Die Mikroskopie der Präparate wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Tropenmedizin Berlin durchgeführt. Zur Auswertung der plazentaren Parasitendichten wurden Parasiten pro Blickfeld (BF) bei eintausendfacher Vergrößerung mit Ölimmersionsobjektiv betrachtet. Die Angabe der plazentaren Parasitämien erfolgte als Parasit / 100 Blickfelder.

Zur Begutachtung des Typs der *P. falciparum*-Infektion wurden die „Dicken Tropfen“ zusätzlich auf die Anwesenheit von Malariapigment in Phagozyten untersucht. Entsprechend der Klassifikation nach Bulmer *et al.* (1993) wurden die Befunde in die folgenden vier Gruppen eingeteilt:

- 1) keine Infektion: Parasiten (nein) Malariapigment (nein)
- 2) akute Infektion: Parasiten (ja) Malariapigment (nein)
- 3) akut-chronische Infektion Parasiten (ja) Malariapigment (ja)
- 4) abgelaufene chronische Infektion Parasiten (nein) Malariapigment (ja)

Diese mikroskopischen Untersuchungen der plazentaren Präparate wurden von Dr. Mockenhaupt am Institut für Tropenmedizin in Berlin durchgeführt und zur Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.7 Bestimmung von Chloroquin und Pyrimethamin

Die Bestimmung der Konzentrationen von Chloroquin und Pyrimethamin im Blut erfolgte mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) durch Dr. T.A. Eggelte am Department of Clinical Pharmacology, Academic Medical Centre, University of Amsterdam.

Im Einzelnen erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Chloroquin wie folgt:

Es wurden monoklonale Antikörper (F73-8) , die sich gegen die 4-Amino-7-Chlorochinolin Struktur des Chloroquinmoleküls richten, eingesetzt (Witte *et al.* 1990). Dabei werden sowohl Chloroquin als auch der Metabolit Desethyl-Chloroquin erfasst. Mikrotiterplatten (96-Loch) wurden mit 4- (1,3-Diaminoprpyol)-7-Chlorochinolin als Antigen beschichtet. 50 µl der Proben

wurden in seriellen Verdünnungen in PBS/Tween-20 aufgebracht. Es folgte die Zugabe von 50 µl einer Lösung des Peroxidase-gekoppelten Chloroquinantikörpers. Diese wurden bei 37°C für 1 Stunde gemischt und inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Substrat Diaminobenzidin zugegeben und die optische Dichte nach einer Stunde mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes (Titertek, Flow Laboratories) ermittelt. Mit Standardlösungen des Chloroquin-Phosphat wurde eine Kalibrierungskurve für jede Mikrotiterplatte erstellt. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Hemmung der optischen Dichte im Vergleich zum Standard angegeben. Aus der Kalibrierungskurve ließ sich die Konzentration von Chloroquin in der jeweiligen Probe ableiten. Eine Konzentration von $\geq 10\text{ng/ml}$ im Plasma galt als therapeutisch wirksam und somit als Chloroquin-positiv (Witte *et al.* 1990).

Im Einzelnen erfolgte die Konzentrationsbestimmung von Pyrimethamin wie folgt:

Es wurden monoklonale Antikörper (F119-3), die sich gegen Cycloguanil richten verwendet. Es besteht eine 100%ige Kreuzreaktivität zwischen Pyrimethamin und Cycloguanil. Mikrotiterplatten (96-Loch) wurden mit 100 µl F119-3-Gemisch (Verdünnung 1:10000 Phosphat-NaCl- Puffer + F119-3) beschichtet. 50 µl der Proben wurden in seriellen Verdünnungen in PBS/Tween-20 aufgebracht. Es folgte die Zugabe von 50 µl einer Lösung des Cycloguanilantikörpers. Diese wurden bei Raumtemperatur für 1 Stunde gemischt und inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Substrat Diaminobenzidin zugegeben, und die optische Dichte nach einer Stunde durch ein Mikrotiterplatten-Lesegerätes (Titertek, Flow Laboratories) ermittelt. Mit Standardlösungen des Cycloguanils wurde eine Kalibrierungskurve für jede Mikrotiterplatte erstellt. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Hemmung der optischen Dichte im Vergleich zum Standard angegeben. Aus der Kalibrierungskurve ließ sich die Konzentration von Pyrimethamin in der jeweiligen Probe ableiten. Eine Konzentration von $\geq 10\text{ng/ml}$ im Plasma galt als Pyrimethamin-positiv.

2.8 Extraktion genomischer DNA

Für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit beschriebenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde vom Verfasser genomische DNA aus den peripheren und plazentaren Blutproben extrahiert. Die Extraktionen erfolgten aus den mit DNA konservierten peripher venösen und plazentaren Blutproben. Bei der Gewinnung genomischer DNA werden primär die zellulären Bestandteile des Blutes unter Einwirkung von Guanidiniumhydrochlorid und Proteinase K lysiert. Freiliegende DNA kann dann an Silikamoleküle binden. Nach wiederholenden Waschschriften mit alkoholischen Lösungsmitteln erfolgt schließlich eine Elution der DNA in wässriger Lösung (Gillespie *et al.* 1979).

2.8.1 Substanzen

- DNA Extraktion - *QIAamp Blood Kits* (Qiagen, Hilden)
- Lyse- Puffer (AL): wässrige Lösung von Guanidiniumhydrochlorid
- Proteinase- K: aus *Tritirachium album*, 1.1 g/ml
- Waschpuffer (AW1): ethanolische Lösung von NaCl u. Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl
- Waschpuffer (AW2): ethanolische Lösung von NaCl u. Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl
- Elutionspuffer (AE): wässrige Lösung von NaCl u. Tris (hydroxymethyl)aminomethan/HCl

2.8.2 Geräte

- Pipette (Gilson) 20µl; 200µl; 1000µl
- Zentrifuge (Hettich; Mikro 24-48 R)
- Reaktionsgefäße (Sarstedt 1900µl); Zentrifugationssäule- Silika- Filter; Auffanghülse (Qiagen)

2.8.3 Protokoll

Es wurden 200 µl Blut (DNA stabilisiertes Blut-Puffer-Gemisch) mit 200 µl Puffer AL und 25 µl Proteinase K (1,1 g/ml) versetzt und auf einem Zellvortexgerät vermischt. Die Proben wurden bei 65°C für 20 min inkubiert und anschließend mit 200 µl absolutem Ethanol versetzt. Dieses Reaktionsgemisch wurde auf eine mit einem Silika-Filter versehene Zentrifugationssäule mit Auffanghülse (Microspin columns, Qiagen, Hilden) übertragen und für eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe. Hierzu wurden für den ersten Waschschriff 500 µl Waschpuffer (AW1) auf den Silika-Filter gegeben und es wurde abermals für eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Beim zweiten Waschschriff wurden 500 µl Waschpuffer (AW2) auf den Silika-Filter gegeben. Diesmal wurde für drei Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurden durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer und einminütigem Zentrifugieren bei 8000 U/min die an den Silika-Filter gebundenen Nukleinsäuren eluiert. Aus 200 µl Blut (DNA- stabilisiertes Blut-Puffer-Gemisch) konnten durch dieses Verfahren ungefähr 6 µg genomische DNA gewonnen werden. Die DNA lag in einer Konzentration von ca. 60 ng/µl vor und wurde für die nachfolgenden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) sofort eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

2.9 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

Die PCR ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis kleinster Mengen genetischen Materials (Saiki *et al.* 1985). Sie ist eine Imitation der DNA-Replikation, wie sie in allen Lebewesen vorkommt. Ausgehend von einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt, der als Matrize dient, wird die gesuchte Gensequenz in repetitiven Reaktionsschritten exponentiell vervielfältigt (amplifiziert). Initial wird der DNA-Doppelstrang bei Temperaturen zwischen 94°C und 99°C denaturiert. Es entsteht einzelsträngige DNA. Durch Temperatursenkung auf die spezifische Temperatur der synthetischen Oligonukleotide werden die den nachzuweisenden Sequenzen anliegenden DNA-Abschnitte durch diese hybridisiert. Die Ansatzstellen dieser kurzkettigen Oligonukleotide oder Primer dienen einer DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen. Diese hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) synthetisiert nach Temperaturanstieg bei ca. 70°C unter Verbrauch eines Gemisches aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) einen der Zielsequenz komplementären DNA-Strang. Diese PCR-Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Polymerisierung) werden je nach gewünschter Reaktion 20-50 mal durchlaufen und führen zu einer exponentiellen Amplifikation des markierten Zielbereiches. Ein abschließender Reaktionsschritt beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase führt zur Vervollständigung teilweise synthetisierter DNA-Stränge.

2.10 Nachweis einer Infektion mit *P. falciparum* durch PCR

Zur Diagnosesicherung der Plasmodienspezies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*), sowie zum Nachweis einer submikroskopischen Infektion, wurden aus den peripher und plazentar gewonnenen Blutproben PCR-Untersuchungen durchgeführt. Da in dieser Arbeit nur die Infektion mit *P. falciparum* untersucht wurde, wird hier ausschließlich auf die diagnostische PCR des *P. falciparum* Bezug genommen. Die speziesspezifische PCR wurde nach Vorgaben von Snounou *et al.* (1993) durchgeführt.

2.10.1 Substanzen

- *Taq*-DNA-Polymerase (Pharmacia): 5000 U/ml
- dNTP - Gemisch (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia): 25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP), 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP), 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP), 25 mM Deoxyguanintriphosphat (dGTP)
- Reaktionspuffer (Pharmacia): 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0

- Primer: rPUL5 (5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3')
rPUL6 (5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3')
rFAL1 (5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3')
rFAL2 (5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3')

2.10.2 Geräte

- Pipetten (Gilson) 20µl; 200µl; 1000µl
- Reaktionsgefäße: 1900µl; 1000µl
- Reaktionsständer (Roth)
- Trithermoblock (Biometra)

2.10.3 PCR-Protokoll

Der Nachweis einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* erfolgte in zwei Schritten. In einem ersten Schritt (äußere PCR) wurde unter Verwendung der Primer rPUL5 und rPUL6 und 2 µl genomischer DNA das spezifische ssRNA (small subunit ribosomal nucleid acid) -Gen der Gattung *Plasmodium* amplifiziert. Dieses Amplifikat diente in einem zweiten Schritt (innere PCR) als Matrize für die Amplifikation spezifischer Bereiche des ssrRNA-Gens der Spezies *P. falciparum*. Für diese innere PCR wurden die Primer rFAL1 und rFAL2 sowie 0,5 µl des Produktes der äußeren PCR verwendet. Die Tabelle 1 beschreibt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowohl der inneren als auch äußeren PCR. Zur Vermeidung einer DNA-Kontamination wurden die Ansätze unter sterilen Bedingungen auf einer DNA-freien Arbeitsbank zusammengestellt. Die Temperaturzyklen der einzelnen zuvor beschriebenen Amplifikationsschritte beschreibt Tabelle 2. Alle Reaktionen erfolgten im Trithermoblock, Biometra.

Das für *P. falciparum* spezifische Amplifikationsprodukt hat eine Länge von 205 Basenpaaren. Der Längennachweis erfolgt durch Gel-Elektrophorese (siehe unten).

Tabelle 1: Reaktionsansätze: diagnostische (innere und äußere) PCR (*P. falciparum*)

| Substanz | Volumen / (µl) | Molarität im Ansatz |
|------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Wasser | 900 | |
| Puffer | 100 | 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ |
| DNTP-Gemisch | 6 | 500 µM |
| Primer 1 | 10 | 160 nM |
| Primer 2 | 10 | 160 nM |
| <i>Taq</i> -Polymerase | 6 | 1 U/l |

Tabelle 2: Reaktionsschritte: diagnostische (innere und äußere) PCR (*P. falciparum*)

| Reaktionsschritt | Temperatur in °C | Reaktionsdauer in min |
|----------------------------|------------------|-----------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 | 5 |
| 2. 25 Zyklen | | |
| 2.1 Denaturierung | 94 | 1 |
| 2.2 Primeranlagerung | 58 | 2 |
| 2.3 Extension | 72 | 2 |
| 3. Abschließende Extension | 72 | 5 |

2.10.4 Längenbestimmung der DNA- Amplifikate durch Gel- Elektrophorese

DNA-Moleküle und ihre Fragmente sind wegen ihrer chemischen Struktur bei neutralem pH-Wert negativ geladen. In einem elektrischen Feld bewegen sie sich deshalb von der Kathode zur Anode. Bei einer Agarose-Gel-Elektrophorese wandern sie durch die Poren des Agarose-Gels. Dabei werden größere Fragmente stärker in ihrer Mobilität gehindert als kleinere. Somit kommt es zur Auftrennung des DNA-Molekülgemisches nach der Größe der Basenpaarlänge. Die Qualität der Agarose sowie ihr Anteil an der Gelmatrix, die anliegende Spannung und die Elektrophoresezeit beeinflussen die Trennschärfe. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA-Molekülen und fluoresziert in ultraviolettem Licht. Wird das Agarose-Gel mit Ethidiumbromid versetzt, können DNA-Fragmente im durchscheinenden UV-Licht sichtbar gemacht werden. Da zugleich DNA-Standards bekannter Basenpaarlänge in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden, kann die Größe der untersuchten Proben ermittelt werden. Zur Durchführung der Gel-Elektrophorese wurde einem modifizierten Protokoll von Sharp *et al.* (1973) gefolgt.

2.10.4.1 Substanzen

- Agarose: (SeaKem LE-Agarose)
- TBE- Laufpuffer: 90 mM Tris-Base (pH 9,0), 90 mM Borsäure, 2 mM Na₂-EDTA, autoklaviert
- Blaumarker: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol
- Ethidiumbromid-Lösung (Boehringer Mannheim): 10 mg/ml Ethidiumbromid
- DNA-Molekulargewichtsmarker VI (Boehringer Mannheim): 0,25 µg/µl pBR322/*HaeIII* (*HaeIII*-geschnittenes Plasmid pBR322) und V (Boehringer Mannheim): pBR322/*Bgl I* + pBR322/*Hinf I*

2.10.4.2 Geräte

- Gelform (Roth);
- Minigelkammer (Biorad);
- Trafo BIO-RAD
- Pipette (Gilson) 20µl; 200µl; 1000µl), Mikrotestplatten (Röhlabo; Roth)

2.10.4.3 Protokoll

Für ein 1,5%iges Agarose-Gel wurden 0,6 g Agarose in 40 ml 0,5 x TBE gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Die entstandene visköse Flüssigkeit wurde mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (0,2 µl/ml) versetzt und in eine Form gegeben. Bei einer Temperatur von ca. 4°C härtete das Gel aus. Durch seine Form entstanden ca. 0,5 X 1,5 mm Taschen, in die später 4,5 µl des PCR-Produkts, versetzt mit 1,5 µl Blaumarker, gegeben wurden. Um die Basenpaarlänge der Amplifikate abzuschätzen, wurden 2 µl der standardisierten Längenmarker (1/5 Vol DNA-Molekulargewichts-Marker V oder VI; 4/5 Vol Blaumarker) parallel aufgetragen. Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde in einer horizontalen Minigelkammer (Biorad) bei einer anliegenden Gleichspannung von 6 V/cm für 40 min durchgeführt. Anschließend wurden DNA-Fragmente im durchscheinenden ultravioletten Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm dargestellt und mit Polaroidfotos dokumentiert.

2.11 Genotypisierung von *P. falciparum*

Zur Genotypisierung von *P. falciparum* wurden die Gene, die für die Merozoiten-Oberflächen-Proteine (*msp-1*, *msp-2*) kodieren, typisiert. Hierzu wurde vom Verfasser das von Snounou *et al.* (1999) beschriebene PCR-Protokoll verwendet. Die PCR erfolgt ebenfalls in zwei Schritten, einer äußeren und einer inneren PCR. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen schematisch die amplifizierten Genbrüche des *msp-1* und *msp-2*.

2.11.1 Geräte

- Pipette (Gilson) 20µl; 200µl; 1000µl
- Reaktionsgefäße: 1900µl; 1000µl (Sarstedt)
- Reaktionsständer (Roth)
- Eisbehälter
- T3 Thermocycler (Biometra)

2.11.2 Substanzen

- *Taq*- DNA- Polymerase (Pharmacia): 5000 U/ml
- dNTP- Gemisch (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia): 25 mM Deoxyadenosintriphosphat (dATP), 25 mM Deoxycytosintriphosphat (dCTP), 25 mM Deoxythymidintriphosphat (dTTP), 25 mM Deoxyguanintriphosphat (dGTP)
- Reaktionspuffer (Pharmacia): 0 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0
- Gelatine: 1 mg/ml
- Aqua dest.: (SmithKline & Beecham)

| • Primer: | <i>msp-1</i> | Sequenz |
|-----------|--------------|---------------------------------------|
| Äußere | M1- OF | 5'-CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG -3' |
| | M1- OR | 5'-CTTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA -3' |
| K1 | M1- KF | 5'-AAATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC-3' |
| | M1- KR | 5'-GCTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA -3' |
| Mad 20 | M1- MF | 5'-AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC-3' |
| | M1- MR | 5'-ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC-3' |
| Ro 33 | M1- RF | 5'-TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG-3' |
| | M1- RR | 5'- CATCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGATC-3' |

| • Primer: | <i>msp-2</i> | Sequenz |
|-----------|--------------|--|
| Äußere | M2- OF | 5'-ATGAAGGTAATTAAAACATTGTCATATTATA -3' |
| | M2- OR | 5'-CTTTGTTACCATCGGTACATTCTT-3' |
| FC27 | M2- FCF | 5'-AATACTAAGAGTGTAGGTGTCARATGCTCCA-3' |
| | M2- FCR | 5'-TTTTATTTGGTGTTCATTGCCAGAACTTGAAC-3' |
| IC | M2- ICF | 5'-AGAAGTATGGCAGAAAGTAAKCCTYCTACT -3' |
| | M2- ICR | 5'-GATTGTAATTCGGGGGATTTCAGTTTGTTCG -3' |

2.11.2.1 Protokoll

Unter Verwendung der Primer M1-OF, M1-OR, M2-OF und M2-OR wurden in einer gemeinsamen äußeren PCR die konservierten Gensequenzen von *msp-1* und *msp-2* amplifiziert. Als Matrize dienten 2 µl genomische DNA. Die Amplifikation erfolgte in einem Reaktionsansatz von 24 µl, dessen Zusammensetzung Tabelle 3 beschreibt. Dieser Reaktionsansatz wurde unter sterilen Bedingungen auf einer PCR-Bank zusammengestellt. Sowohl äußere als auch innere PCR wurden im T3-Thermocycler (Biometra) nach den in Tabelle 2 bzw. 4 gezeigten Temperaturzyklen durchgeführt.

Tabelle 3: Reaktionsansätze der äußeren PCR (*msp-1*, *msp-2*)

| Substanz | Volumen / (µl) | Molarität im Ansatz |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Wasser | 19 | |
| Puffer | 2,5 | 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ |
| Gelatine 1mg/ml | 2,5 | 0,1mg/ml |
| dNTP- Gemisch | 0,125 | 500 µM |
| M1-OF | 0,2 | 160 nM |
| M1-OR | 0,2 | 160 nM |
| M2-OF | 0,2 | 160 nM |
| M2-OR | 0,2 | 160 nM |
| <i>Taq</i> - Polymerase | 0,2 | 1 U/l |

Tabelle 4: Reaktionsschritte der äußeren PCR (*msp-1*, *msp-2*)

| Reaktionsschritt | Temperatur in °C | Reaktionsdauer in min |
|----------------------------|------------------|-----------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 | 5 |
| 2. 35 Zyklen | | |
| 2.1 Denaturierung | 94 | 1 |
| 2.2 Primeranlagerung | 58 | 2 |
| 2.3 Extension | 72 | 2 |
| 3. Abschließende Extension | 72 | 10 |

Als Matrize zur Amplifikation der Allele von *msp-1* und *msp-2* diente 1 µl des Produktes der äußeren Reaktionen. Hierzu wurden entsprechend der Allelfamilien (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC) fünf unabhängige innere PCRs durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung spezifischer Primer in einem Reaktionsgemisch von 49 µl. Tabelle 5 beschreibt die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches. Tabelle 6 zeigt den Reaktionsablauf im T3-Thermocycler.

Tabelle 5: Reaktionsansätze der innere PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC)

| Substanz | Volumen / (µl) | Molarität im Ansatz |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Wasser | 38 | |
| Puffer | 5 | 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ |
| Gelatine | 5 | 1mg/ml (Konzentration) |
| dNTP- Gemisch | 0,35 | 500 µM |
| Spez. Primer 1 | 0,4 | 160 nM |
| Spez. Primer 2 | 0,4 | 160 nM |
| <i>Taq</i> - Polymerase | 0,3 | 1 U/l |

Tabelle 6: Reaktionsschritte der inneren PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC)

| | Reaktionsschritt | Temperatur in °C | Reaktionsdauer in min |
|-----|-------------------------|------------------|-----------------------|
| 1. | Initiale Denaturierung | 95 | 5 |
| 2. | 30 Zyklen | | |
| 2.1 | Denaturierung | 94 | 1 |
| 2.2 | Primeranlagerung | 61 | 2 |
| 2.3 | Extension | 72 | 2 |
| 3. | Abschließende Extension | 72 | 5 |

2.12 Nachweis der Längenpolymorphismen von *msp-1* und *msp-2*

Die Längenpolymorphismen der einzelnen Allele des *msp-1*-Gens und *msp-2*-Gens wurden durch hochauflösende Gelelektrophorese und anschließende rechnergestützter Bildanalyse nachgewiesen und ausgewertet.

2.12.1 Substanzen

- TBE- Laufpuffer: 90 mM Tris- Base (pH 9,0), 90 mM Borsäure, 2 mM Na₂-EDTA, autoklaviert
- Blaumarker: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol
- Ethidiumbromid- Lösung (Boehringer Mannheim): 10 mg/ml Ethidiumbromid
- DNA-Molekulargewichtsmarker 100 BP (Pharmacia)

2.12.2 Geräte

- Gelform: (Nils und Hagen Eckert)
- Elektrophoresekammer: 18cm x 15cm (Roth)
- Trafo: BIO RAD 200/2
- Pipetten (Eppendorf): 10mcl; 200mcl; 1000mcl
- UV-Licht-Bank: (Fröbel-Labortechnik)
- Kamera: CU-5 (Polaroid); PC-Scanner: ASTRA UMAX-5450
- Software: Kodak- Imaging; Umax- VistaScan; Biometra- BioDocAnalyze

2.12.3 Protokoll

Zur hochauflösenden Gel-Elektrophorese wurde ein 2%ige GTG-Agarose-Gel mit einem Volumen von 200 ml und einer Lauflänge von ca. 8 cm genutzt. Es wurden 4 g reine GTG-Agarose mit 200 ml TBE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle für ca. 3 min verkocht. Die visköse Flüssigkeit wurde mit 5 µl Ethidiumbromid (0,2 µl/ml) versetzt und in eine Gelform gegeben. Nach einer Aushärtzeit von ca. 20 min bei einer Temperatur von 4°C wurde das Gel in einer horizontalen Elektrophoresekammer platziert. Die Substrattaschen (0,5 x 1,5 mm) wurden mit einem Gemisch aus je 10 µl des Reaktionsproduktes der inneren PCR und 0,6 µl Bromphenolblaumarker gefüllt. Zum besseren Vergleich wurden PCR-Amplifikate plazentar und peripher gewonnener Isolate von einer Patientin in direkt nebeneinanderliegende Substrattaschen gegeben. Als Referenz wurden in zwei Taschen Längenstandards mit einer Schrittweite von 100 Basenpaaren gegeben. Nach einer Elektrophoresezeit von 2 h bei einer Spannung von 80 V wurden bei Durchleuchtung mit UV-Strahlung die Amplifikatbanden durch Polaroid-Fotografie dokumentiert. Die Bilder wurden zur weiterführenden Auswertung mit dem PC-Scanner eingelesen und in eine digitales Format umgewandelt. Diese wurden in das Auswertungsprogramm BioDocAnalyze (Biometra) importiert. Suchalgorithmen dieses Programms durchsuchten den zur Auswertung bestimmten Bereich der Bildvorlage. Dabei wurden primär horizontale Spuren definiert. In einem zweiten Schritt wurden die vertikalen Amplifikatbanden durch eine standardisierte Densitographie ermittelt und graphisch gekennzeichnet. Da es aufgrund der Größe der Elektrophoresegele und der relativ langen Elektrophoresedauer in einigen Fällen zu einem ungleichmäßigen Laufmuster kam, musste bei einem Teil der Bildvorlagen eine programmgesteuerte Entzerrung vorgenommen werden. Dazu wurde eine Reihe von vorgegebenen Kurven dem tatsächlichen Verlauf so angepasst, dass Banden mit gleichem bekanntem Molekulargewicht sich auf gleicher Linie befanden. Hierzu mussten einige Gitterlinien nachträglich definiert werden. Die Koordinaten der gekennzeichneten Banden waren damit festgelegt. Zur Auswertung dieser Banden wurden den standardisierten Banden das spezifische Molekulargewicht bzw. die bekannte Basenpaarlänge zugeordnet. BioDocAnalyze konnte nun den gekennzeichneten Banden ein entsprechendes spezifisches Molekulargewicht bzw. eine spezifische Basenpaarlänge zuordnen.

2.13 Allel-Einteilung entsprechend der Basenpaarlänge der PCR-Amplifikate

Zur Bestimmung der Diversität von *P. falciparum* wurden die Amplifikate gruppiert. Aus Amplifikaten mit entsprechender Basenpaarlänge konnte auf einzelne Allele geschlossen werden. In Anlehnung an Snounou *et al.* (1999) erfolgte die Alleleinteilung entsprechend der Allelfamilien K1, Mad 20 und Ro 33 für das *msp-1*-Gen und FC27 und IC für das *msp-2*-Gen. PCR-Fragmente einer Allelfamilie, die bei der Gelelektrophorese in einem definierten Bereich von 20 Basenpaaren lagen, galten als identische Allele und wurden mit steigendem Zahlenwert benannt (Snounou *et al.* 1999). Diese Allele waren spezifisch für die Infektion mit spezifischen Klonen bzw. Genotypen. Zur Vereinfachung werden in dieser Arbeit die Begriffe Allel, Genotyp und Stamm als Synonyme gebraucht (Einteilung siehe Tabelle 8).

2.14 Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum*

Die Bestimmung der Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum* richtete sich ebenfalls nach Vorgaben von Snounou *et al.* (1999). Hierzu wurden jeweils aus peripher und plazentar gewonnenen Isolaten die Summe aller nachgewiesenen Allele sowohl für *msp-1* als auch für *msp-2* unabhängig voneinander bestimmt und nachfolgend addiert. Die Summe mit dem größeren Betrag ergab die Multiplizität der Infektion. Die Tabelle 7 zeigt einzelne Beispiele zur Bestimmung der Multiplizität der Infektion:

Tabelle 7: Beispiele zur Bestimmung der Multiplizität der Infektion (MOI)

| | FC27 | IC | <i>msp-2</i> Σ FC27; IC | K1 | Mad 20 | Ro 33 | <i>msp-1</i> Σ K1; Mad20; Ro 33 | MOI Max (<i>msp-1</i> ; <i>msp-2</i>) |
|----------------------|------|----|----------------------------|----|--------|-------|------------------------------------|--|
| | 2 | 3 | 5 | 2 | 2 | 2 | 6 | 6 |
| Anzahl der Fragmente | 4 | 2 | 6 | 3 | 1 | 1 | 5 | 6 |
| | 0 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 |

msp-1 = Summe aller nachgewiesenen Allele der Allelfamilien K1; Mad20; Ro 33, *msp-2* = Summe aller nachgewiesenen Allele der Allelfamilien FC 27, IC; Summe mit dem größeren Betrag ergab die Multiplizität der Infektion = MOI Max (*msp-1*; *msp-2*).

Tabelle 8: Einteilung der Genotypen

| BP-Länge der PCR-Fragmente | Genotypen (peripheres Isolat) | | Genotypen (plazentares Isolat) | |
|----------------------------|-------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| 120-139 | K1M01 | MAD20M01 | K1P01 | MAD20P01 |
| 140-159 | K1M02 | MAD20M02 | K1P02 | MAD20P02 |
| 160-179 | K1M03 | MAD20M03 | K1P03 | MAD20P03 |
| 180 | | | | |
| 180-199 | K1M04 | MAD20M04 | K1P04 | MAD20P04 |
| 200-219 | K1M05 | MAD20M05 | K1P05 | MAD20P05 |
| 220 | | | | |
| 220-239 | K1M06 | MAD20M06 | K1P06 | MAD20P06 |
| 240-259 | K1M07 | MAD20M07 | K1P07 | MAD20P07 |
| 260-279 | K1M08 | MAD20M08 | K1P08 | MAD20P08 |
| 280-299 | K1M09 | MAD20M09 | K1P09 | MAD20P09 |
| 300-319 | K1M10 | MAD20M10 | K1P10 | MAD20P10 |
| 320-339 | K1M11 | MAD20M11 | K1P11 | MAD20P11 |
| | | | | |
| 120-139 | ICM01 | FCP01 | ICM01 | FCP01 |
| 140-159 | ICM02 | FCP02 | ICM02 | FCP02 |
| 160-179 | ICM03 | FCP03 | ICM03 | FCP03 |
| 180-199 | ICM04 | FCP04 | ICM04 | FCP04 |
| 200-219 | ICM05 | FCP05 | ICM05 | FCP05 |
| 220-239 | ICM06 | FCP06 | ICM06 | FCP06 |
| 240-259 | ICM07 | FCP07 | ICM07 | FCP07 |
| 260-279 | ICM08 | FCP08 | ICM08 | FCP08 |
| 280-299 | ICM09 | FCP09 | ICM09 | FCP09 |
| 300-319 | ICM10 | FCP10 | ICM10 | FCP10 |
| 320-339 | ICM11 | FCP11 | ICM11 | FCP11 |
| 340-359 | ICM12 | FCP12 | ICM12 | FCP12 |
| 360-379 | ICM13 | FCP13 | ICM13 | FCP13 |
| 380-399 | ICM14 | FCP14 | ICM14 | FCP14 |
| 400-419 | ICM15 | FCP15 | ICM15 | FCP15 |
| 420-439 | ICM16 | FCP16 | ICM16 | FCP16 |
| 440-459 | ICM17 | FCP17 | ICM17 | FCP17 |
| 460-479 | ICM18 | FCP18 | ICM18 | FCP18 |
| 480-499 | ICM19 | FCP19 | ICM19 | FCP19 |
| 500-519 | ICM20 | FCP20 | ICM20 | FCP20 |
| 520-539 | ICM21 | FCP21 | ICM21 | FCP21 |
| 540-559 | ICM22 | FCP22 | ICM22 | FCP22 |
| 560-579 | ICM23 | FCP23 | ICM23 | FCP23 |
| 580-599 | ICM24 | FCP24 | ICM24 | FCP24 |
| 600-620 | ICM25 | FCP25 | ICM25 | FCP25 |

Dargestellt sind einzelne Allele des *msp-1* und *msp-2* mit Basenpaarlängen (BP-Länge) der PCR-Amplifikate der inneren PCR; peripheres Isolat (M), plazentares Isolat (P).

2.15 Statistische Berechnungen

Die Grundlagen der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen basieren auf den Handbüchern von Wernecke (Institut für medizinische Biometrie, HU-Berlin), Kreienbrock und Schach (2000), sowie Sachs (1999). Alle Berechnungen wurden mit den Programmen Excel (Microsoft) oder SPSS 10.0 durchgeführt.

2.15.1 Assoziationsberechnungen

Um Assoziationen von Variablen nominalen Charakters zu analysieren, wurden mehrere Verfahren zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen durchgeführt. Zuerst wurde die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ formuliert. Traf die Nullhypothese zu, so waren die Merkmale voneinander unabhängig. Traf sie nicht zu, so wurde die Alternativhypothese formuliert, d.h. es bestand ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen. Um die Häufigkeiten dieser Merkmale bzw. Merkmalskombinationen zu analysieren, wurden die Daten jeweils auf 2 x 2 Felder-Tafeln (Tab. 9) überführt und dann der *Chi²-Test* durchgeführt. Bei diesem Test werden die tatsächlichen gegenüber den erwarteten Beobachtungen verglichen.

Tabelle 9: 2 x 2 Felder-Tafel unabhängiger Stichproben; Häufigkeiten (w, t, u, v)

| | | Polyklonalität | | |
|--------------------|--------|----------------|------|--------|
| | | ja | nein | gesamt |
| Frühgeburtlichkeit | ja | w | t | w+t |
| | nein | u | v | u+v |
| | gesamt | w+u | t+v | n |

Wurden im *Chi²-Test* signifikant von der Nullhypothese der Unabhängigkeit abweichende Häufigkeiten von Merkmalsausprägungen gefunden, erfolgte bei geeigneten Vergleichen die Bestimmung der Odds Ratio (OR) als Maß für die Stärke der Assoziation. Die Odds-Ratio ist als das „Chancenverhältnis“, mit der eine Merkmalsausprägung in einer Stichprobe auftritt, zu verstehen. Die Odds-Ratio aus dem obigen Beispiel berechnet sich als: $OR = a \times d / b \times c$. Dabei wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet. Mit Hilfe des *Chi²-Test für Trend* wurden Assoziationen zwischen ordinalen Variablen, die zu Gruppen zusammengefasst wurden, berechnet. Dabei wurde die Hypothese überprüft, ob sich Ausprägungen zwischen Variablen, die in logischer Reihe standen, signifikant voneinander unterscheiden.

Waren vergleichende Stichproben voneinander abhängig (oder verbunden), wurde der *Chi²-Test nach McNemar* angewandt. Dieser Test wird nachfolgend näher beschrieben. Die 2x2-Tafel wird in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10: 2 x 2 Felder-Tafel abhängiger Stichproben; Häufigkeiten (w, t, u, v)

| | | Allelnachweis (plaz. Isolat) | | gesamt |
|--------------------------------|------------|------------------------------|------------------|--------|
| | | Allel ja | Allel nein | |
| Allelnachweis (periph. Isolat) | Allel ja | w [$\pi(x,x)$] | t [$\pi(x,y)$] | w+t |
| | Allel nein | u [$\pi(y,x)$] | v [$\pi(y,y)$] | u+v |
| | gesamt | w+u | t+v | n |

In der Tabelle stehen die Wahrscheinlichkeiten [$\pi(x,x)$, $\pi(x,y)$, $\pi(y,x)$, $\pi(y,y)$] der Populationen hinter den Häufigkeiten (w,t,u,v) in Klammern, um deren Vergleich es geht. Bei der Beurteilung möglicher Unterschiede spielen nur unterschiedliche Merkmalsausprägungen eine Rolle. Bei verbundenen Stichproben lässt sich deshalb die Nullhypothese als $H_0: \pi(x,y) = \pi(y,x)$ angeben.

Die verbundenen Stichproben unterscheiden sich nicht, wenn die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten ungleichartiger Ausprägungen gleich sind.

Als Prüfgröße dient der McNemar-Test: $\chi^2 = (t-u)^2 / t+u$

Die Nullhypothese wird abgelehnt bei $p < 0,05$. Es wird die Alternativhypothese formuliert (Wernecke, Skript Medizinische Biometrie, HU-Berlin).

Waren stetige Variablen normal verteilt, so erfolgte der t-Test nach Student, um Assoziationen zu bestimmten Merkmalsausprägungen zu analysieren. Dieser Test vergleicht die Mittelwerte zweier Stichproben und klärt die Frage, ob auftretende Mittelwertabweichungen sich durch zufällige Schwankungen erklären lassen oder nicht.

Im Falle von stetigen Variablen, die nichtparametrisch verteilt waren, wurde der U-Test nach Mann-Whitney angewandt. Dieser auf dem sogenannten Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierende Rangtest ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte stetiger Verteilungen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde bei beiden Testverfahren die Nullhypothese formuliert, so dass zwischen zwei verglichenen Messreihen kein Unterschied vorliegt.

Um mehrere unabhängige Stichproben zu vergleichen, wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis angewandt. Dieser H-Test ist eine Verallgemeinerung des oben angeführten U-Tests. Bei unabhängigen Stichproben, die durch eine Gruppenvariable definiert waren und aus derselben Grundgesamtheit stammten, wurde der H-Test nach Jonckheere-Terpstra durchgeführt. Dieser Test eignet sich für stetige oder geordnete kategoriale Daten. Er ist aussagekräftiger als der Kruskal-Wallis-Test, wenn die Grundgesamtheiten ordinales Messniveau aufweisen.

Um den unabhängigen Einfluß von verschiedenen Variablen auf eine binäre Zielgröße zu untersuchen, wurden logistische Regressionsmodelle verwendet. Die sich daraus ergebenden adjustierten Odds-Ratios mit ihren 95% Konfidenzintervallen beschreiben demnach die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variable mit der Zielgröße assoziiert ist, und berücksichtigt dabei den potentiellen Einfluss anderer, ebenfalls assoziierter Variablen. Multiple logistische Regressionen wurde verwendet, um unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten zum Beispiel einer Frühgeburtlichkeit zu definieren. Dadurch konnten sich überlappende Einflussgrößen, wie z.B. die Parasitdichte, eine Anämie sowie die Multiplizität der Infektion, in ihrer Auswirkung getrennt analysiert werden. Unabhängige Variablen wurden in das Regressionsmodell eingegeben, wenn sie in univariater Analyse signifikant mit der abhängigen Variablen assoziiert waren ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Studiengruppe

Im Zeitraum vom 24.01.2000 bis 24.01.2001 entbanden 893 Frauen am Presbyterian Mission Hospital Agogo. Bei 474 Frauen wurde in der plazentaren Blutprobe mittels PCR eine Infektion mit *P. falciparum* diagnostiziert. Diese stellen die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit dar.

3.1.1 Wohnort, Alter, Parität

51% (n = 243) dieser Frauen stammten aus der Stadt Agogo, 48% (n = 231) aus den umliegenden Dörfern. Das durchschnittliche Alter der Gebärenden betrug 25 Jahre. Das Alter der jüngsten Frau war 15 Jahre, das der Ältesten 44 Jahre. Das durchschnittliche Alter der Erstgebärenden war 20,9 Jahre. Nach der Anzahl der bisherigen Geburten (incl. der aktuellen) wurden die Frauen in Primiparae (41%; n = 194), Secundiparae (24%, n = 116), Parae 3 (13%, n = 63) und Parae ≥ 4 (21%, n = 101) eingeteilt. Die Kenndaten der Gebärenden und ihrer Neugeborenen sind in Tabelle 11 dargestellt.

3.1.2 Hb-Konzentrationen und Anämie

Die ermittelten Hb-Konzentrationen der Untersuchten lagen zwischen 4,6 und 15,6 g/dl, (Mittelwert: $11,0 \pm 1,7$ g/dl Standardabweichung). Bei 46,1% (n = 217) der Gebärenden bestand eine Anämie mit Hb-Konzentrationen von weniger als 11 g/dl. Eine moderate Anämie mit Werten von unter 9 g/dl wurde bei 12,3% (n = 58) der Patientinnen beobachtet. Tendenziell nahm die Prävalenz einer moderaten Anämie in Bezug zur Parität ab (Tab. 11).

3.1.3 Gestationsalter und Geburtsgewicht

Da es bei Geburten von Zwillingen (n = 26) starke Abweichungen der Normalwerte für das Geburtsgewicht sowie der Körpergröße gab, wurden diese Kinder nicht in die folgenden Berechnungen einbezogen. Das mittlere Geburtsgewicht der Neugeborenen betrug 2880 g (1280-4350) (n = 448). Sie hatten eine durchschnittliche Größe von 48,2 cm (39-56). Der Median des Gestationsalters war 38,3 Wochen (29,1-43,5). 17,3% (n = 75/433) der Neugeborenen wurden zu früh geboren (< 37. SSW [Schwangerschaftswoche]). Bei Primiparae kam es signifikant häufiger zu einer Frühgeburt. Vor der 37. SSW gebaren 26,4% (n = 51/194) aller Primiparae (p-Wert [χ^2 -Test] < 0,001). 21,9% (n = 100/456) aller Neugeborenen wiesen ein Geburtsgewicht von unter 2500 g auf. 33,3% der Kinder (n = 65/194) erstgebärender Frauen waren von einem LBW betroffen. Dies war im Vergleich zu Multiparae signifikant häufiger (p-

Wert [χ^2 -Test] < 0,001). Bei 10% aller Kinder (n = 45/448) wurde eine Intrauterine Retardierung (IUR) beobachtet. Diese Kinder wurden zwar termingerecht, aber mit einem LBW geboren. Ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz einer IUR in Bezug zur Parität wurde nicht beobachtet (Tab. 11).

Tabelle 11: Kenndaten der Gebärenden und Neugeborenen

| Mütter | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|--------|
| Schwangerschaftszahl | P1 | P2 | P3 | P \geq 4 | Total | p-Wert |
| Anzahl (n) | 194 | 116 | 63 | 101 | 474 | |
| Alter (Jahre); Mtw. \pm Stabw. | 20,9 \pm 3,5 | 24,5 \pm 3,6 | 27,6 \pm 4,26 | 31,9 \pm 4,6 | 25,1 \pm 5,7 | 0,001 |
| % Wohnort (Agogo/ Dörfer) | 49,7 / 50,3 | 56,0 / 44,0 | 52,4 / 47,6 | 47,5 / 52,5 | 51,2 / 48,8 | 0,6 |
| % Anämie (Hb < 11g/dl) | 51,6 | 42,6 | 46,0 | 39,6 | 46,1 | 0,2 |
| % Anämie (Hb < 9g/dl) | 16,1 | 10,4 | 9,5 | 8,9 | 12,3 | *0,06 |
| Hb-Wert (g/dl); Mtw \pm Stabw | 10,8 \pm 1,7 | 11,1 \pm 1,6 | 11,0 \pm 1,7 | 11,2 \pm 1,8 | 11,0 \pm 1,7 | 0,04 |
| Kinder | | | | | | |
| Neugeborenen | Kinder P1 | Kinder P2 | Kinder P3 | Kinder P \geq 4 | Total | p-Wert |
| Gestationsalter, Median [Bereich] | 38,3 [29,1-43,5] | 38,3 [34,5-43,1] | 39,3 [34,0-42,0] | 39,3 [30,4-42,0] | 38,3 [29,1-43,5] | *0,001 |
| % Frühgeburtlichkeit | 26,4 | 20,6 | 3,4 | 4,5 | 17,3 | 0,001 |
| Gebgew. (g); Mtw. \pm Stabw. | 2701 \pm 514 | 2938 \pm 451 | 3009 \pm 402 | 3080 \pm 483 | 2880 \pm 456 | *0,001 |
| Körpergröße (cm); Mtw. \pm Stabw. | 47,5 \pm 2,8 | 48,2 \pm 2,8 | 49,0 \pm 2,4 | 49,1 \pm 2,3 | 48,2 \pm 2,7 | *0,001 |
| % LBW | 33,3 | 15,7 | 11,9 | 13,5 | 21,9 | <0,001 |
| % IUR | 13,6 | 7,5 | 8,8 | 6,7 | 10,0 | 0,2 |

P1: Primiparae, P2: Secundiparae, P3: Terciparae, P \geq 4: Parae \geq 4; Mtw.: Mittelwert; Stabw.: Standardabweichung; Hb: Hb-Konzentration; p-Wert (Kruskal-Wallis-Test) bzw. *p-Wert (χ^2 -Test für Trend), Mtw.: Mittelwert; Stabw.: Standardabweichung; Hb: Hb-Konzentration; LBW: Low Birth Weight (engl.: niedriges Geburtsgewicht; Def.: Neugeborene mit einem Geburtsgewicht < 2500g). Für die Erhebung der Frühgeburtlichkeit und des Geburtsgewichts, sind nur Daten von Einlingsgeburten einbezogen worden; p-Wert (Kruskal-Wallis-Test) bzw. *p-Wert (χ^2 -Test für Trend), IUR= Intrauterine Retardierung (2500 g + \geq 37. SSW).

3.2 Parasitendichten in Bezug zur Parität

3.2.1 Plazentare Parasitendichten

Bei 61% der Schwangeren wurde eine plazentare Infektion mikroskopisch nachgewiesen. Die Parasitendichten lagen hier zwischen 1 und 180000 P/10² BF (Parasiten/100 Blickfelder) (geometrisches Mittel: 28 P/10² BF). Weitere 181 Infektionen (39%) wurden ausschließlich durch eine PCR nachgewiesen und galten somit als submikroskopische Infektionen. Für diese Fälle wurde eine Parasitendichte von 2 P/10² BF gesetzt.

Plazenten von Primiparae wiesen die höchsten mittleren Parasitendichten auf (geometrisches Mittel: 56 P/10²BF). Mit zunehmender Parität fielen die Parasitendichten. Die Prävalenz submikroskopischer Infektionen stieg von 26% bei Primiparae auf 59% bei Frauen mit vier oder mehr Geburten. Die Abbildung 6 zeigt das geometrische Mittel der plazentaren Parasitendichten sowie die Prävalenz submikroskopischer Infektionen in Bezug zur Parität.

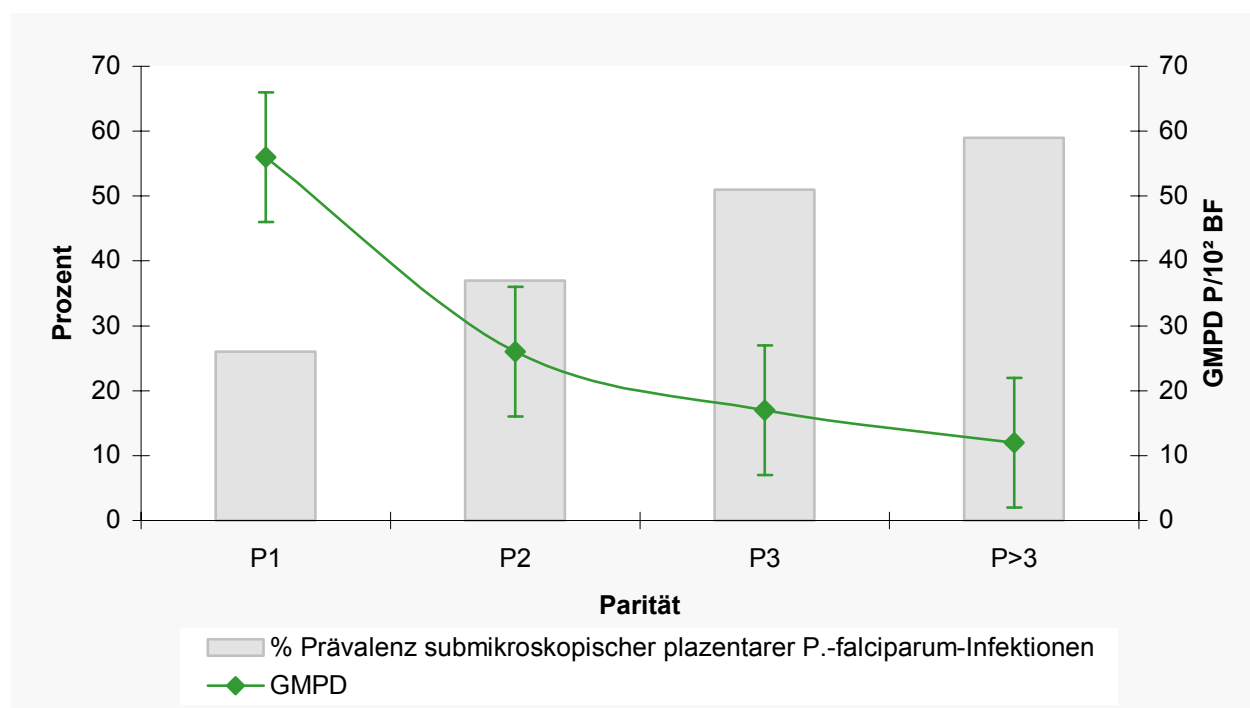


Abbildung 6: Geometrisches Mittel plazentarer Parasitendichten (GMPD) und Prävalenz submikroskopischer plazentarer Infektionen in Abhängigkeit zur Parität

GMPD (geometrische Mittel der Parasitendichten) der plazentaren Infektion von *P. falciparum* mit 95% Konfidenzintervall in Bezug zur Parität, Prävalenz submikroskopischer Infektionen in Bezug zur Parität; (P1 = Parae 1, P2 = Parae 2, P3 = Parae 3, P > 3 = Parae > 3).

3.2.2 Periphere Parasitendichten

Von den 474 Patientinnen mit einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion konnte in 12% der Fälle keine Infektion in der peripheren Blutprobe nachgewiesen werden. Nur 36% der peripheren Infektionen konnten mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Parasitendichten lagen hier zwischen 5 und 52847 P/ μ l (GMP = 10,8 P/ μ l). Die periphere Parasitendichte fiel signifikant mit der Parität (p-Wert [Kruskal-Wallis-Test] < 0,001). In 64% der Fälle erfolgte der Nachweis einer Infektion von *P. falciparum* ausschließlich durch die PCR. Für diese Fälle wurde eine Parasitendichte von 2 P/ μ l gleichgesetzt. Der Anteil peripherer submikroskopischer Infektionen stieg mit der Parität (p-Wert [χ^2 -Test für Trend]= 0,02). Der Zusammenhang von peripherer Parasitendichte und Prävalenz submikroskopischer peripherer Infektionen im Bezug zur Parität wird in Abbildung 7 dargestellt.

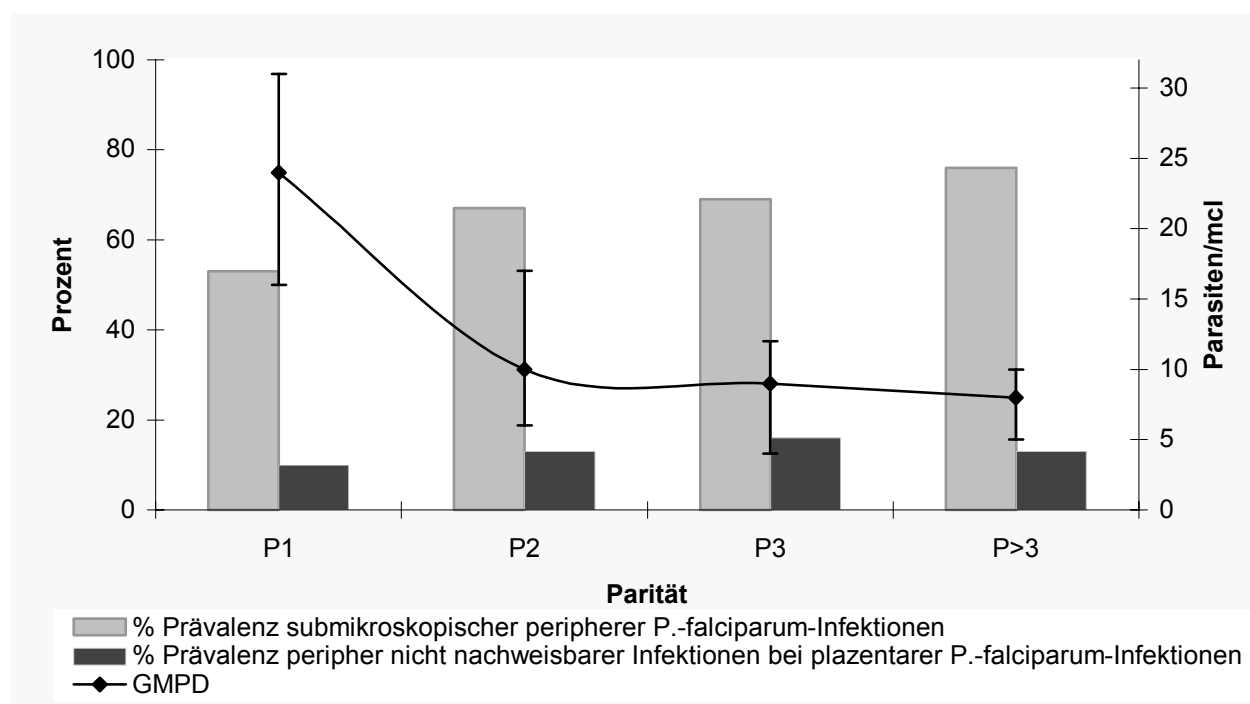


Abbildung 7: Geometrisches Mittel der peripheren Parasitendichte bei plazentarer *P.-falciparum*-Infektion und Prävalenz submikroskopischer Infektionen sowie Anzahl peripher nicht nachweisbarer Infektionen

GMPD (geometrisches Mittel der peripher bestimmten Parasitendichte), Prävalenz submikroskopischer peripherer *P.-falciparum*-Infektionen sowie die Prävalenz peripher nicht nachweisbarer *P.-falciparum*-Infektionen bei plazentarer Infektion in Bezug zur Parität. (P1 = Parae 1, P2 = Parae 2, P3 = Parae 3, P > 3 = Parae > 3).

3.3 Diversität von *P. falciparum*

3.3.1 Diversität von *P. falciparum* in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten

Insgesamt konnten in der gesamten Studiengruppe 22 verschiedene Allele der *msp-1*-Allelfamilien (K1, Mad20 und Ro33) und 40 Allele der bekannten Allelfamilien IC und FC27 von *msp-2* typisiert werden (Tab.12).

Es wurde weiterhin untersucht, ob einzelne dieser Genotypen signifikant häufiger in plazentar gewonnenen Isolaten im Vergleich zu peripher gewonnenen Isolaten auftraten. Für diese Untersuchung wurde für jeden der 62 Genotypen der McNemar-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Am Beispiel des K1-07 zeigte sich folgende Verteilung: Dieser Genotyp wurde in der Gesamtgruppe (n = 474) bei 90 Patientinnen in einem plazentar gewonnenen Isolat und bei 62 Patientinnen in einem peripher gewonnenen Isolat identifiziert. Bei 42 der 90 Patientinnen trat dieser Genotyp ausschließlich plazentar auf, konnte also nicht peripher nachgewiesen werden. Nur in 16 der 62 Fälle trat dieser Genotyp ausschließlich peripher, nicht aber plazentar auf. K1-07 trat also signifikant häufiger ausschließlich plazentar auf. Neben diesem wurden die Genotypen Mad20-02, IC-10, IC-19, IC-20, FC27-08, FC27-12, FC27-16, FC27-18 und FC27-20 signifikant häufiger ausschließlich plazentar beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden RO33-1 und Ro33-2 signifikant häufiger peripher beobachtet (Tab.12).

Tabelle 12: Prävalenz aller Genotypen in plazentaren und peripheren Isolaten (statistischer Vergleich)

| Genotypen | gesamt plazentare Genotypen | nur plazentare Genotypen | Plazentare & periphere Genotypen | nur periphere Genotypen | gesamt periphere Genotypen | p-Wert McNemar |
|-----------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| K1-01 | 6/474 | 3/6 | 3 | 1/4 | 4/474 | |
| K1-02 | 9/474 | 5/9 | 4 | 2/6 | 6/474 | |
| K1-03 | 17/474 | 7/17 | 10 | 7/17 | 17/474 | |
| K1-04 | 51/474 | 17/51 | 34 | 9/43 | 43/474 | |
| K1-05 | 92/474 | 35/92 | 57 | 23/80 | 80/474 | |
| K1-06 | 88/474 | 27/88 | 61 | 24/85 | 85/474 | |
| K1-07 | 90/474 | 42/90 | 48 | 16/64 | 62/474 | P*=0,001 |
| K1-08 | 48/474 | 25/48 | 23 | 25/48 | 48/474 | |
| K1-09 | 27/474 | 18/27 | 9 | 16/25 | 25/474 | |
| K1-10 | 22/474 | 13/22 | 9 | 10/19 | 19/474 | |
| K1-11 | 8/474 | 6/8 | 2 | 4/6 | 6/474 | |
| MAD20-01 | 6/474 | 3/6 | 3 | 3/6 | 6/474 | |
| MAD20-02 | 13/474 | 9/13 | 4 | 1/5 | 5/474 | P*=0,021 |
| MAD20-03 | 23/474 | 11/23 | 12 | 11/23 | 23/474 | |
| MAD20-04 | 32/474 | 13/32 | 19 | 9/28 | 28/474 | |
| MAD20-05 | 56/474 | 22/56 | 34 | 14/48 | 48/474 | |
| MAD20-06 | 55/474 | 26/55 | 29 | 9/38 | 38/474 | |
| MAD20-07 | 22/474 | 6/22 | 16 | 7/23 | 23/474 | Fortsetzung: folgende Seite |
| MAD20-08 | 10/474 | 7/10 | 3 | 2/5 | 5/474 | |
| MAD20-09 | 10/474 | 4/190 | 6 | 1/7 | 7/474 | |

Fortsetzung: Tabelle 12

| Genotypen | gesamt plazentare Genotypen | nur plazentare Genotypen | plazentare & periphere Genotypen | nur periphere Genotypen | gesamt periphere Genotypen | p-Wert McNemar |
|-----------|-----------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| R033-01 | 137/474 | 22/137 | 115 | 41/156 | 156/474 | P*=0,023 |
| R033-02 | 12/474 | 7/12 | 5 | 20/25 | 25/474 | P*=0,019 |
| IC-04 | 5/474 | 3/5 | 2 | 0/2 | 2/474 | |
| IC-05 | 9/474 | 4/9 | 5 | 1/6 | 6/474 | |
| IC-06 | 12/474 | 8/12 | 4 | 3/7 | 7/474 | |
| IC-07 | 36/474 | 19/36 | 17 | 8/25 | 25/474 | |
| IC-08 | 36/474 | 14/36 | 21 | 8/29 | 29/474 | |
| IC-09 | 53/474 | 26/53 | 27 | 9/36 | 36/474 | |
| IC-10 | 42/474 | 17/42 | 25 | 10/35 | 35/474 | P*=0,006 |
| IC-11 | 65/474 | 21/65 | 44 | 14/58 | 58/474 | |
| IC-12 | 57/474 | 24/57 | 33 | 6/39 | 39/474 | |
| IC-13 | 71/474 | 18/71 | 53 | 14/67 | 67/474 | |
| IC-14 | 59/474 | 21/59 | 38 | 9/47 | 47/474 | |
| IC-15 | 57/474 | 23/57 | 34 | 11/45 | 45/474 | |
| IC-16 | 51/474 | 24/51 | 27 | 11/38 | 38/474 | |
| IC-17 | 46/474 | 17/46 | 29 | 5/34 | 34/474 | |
| IC-18 | 51/474 | 22/51 | 29 | 7/36 | 36/474 | |
| IC-19 | 25/474 | 13/25 | 12 | 2/14 | 14/474 | P*=0,043 |
| IC-20 | 26/474 | 11/26 | 15 | 4/19 | 19/474 | P*=0,041 |
| IC-21 | 22/474 | 13/22 | 9 | 5/14 | 14/474 | |
| IC-22 | 12/474 | 8/12 | 4 | 3/7 | 7/474 | |
| IC-23 | 6/474 | 4/6 | 2 | 1/3 | 3/474 | |
| IC-24 | 5/474 | 3/5 | 2 | 0/2 | 2/474 | |
| FC27-04 | 10/474 | 4/10 | 6 | 2/8 | 8/474 | |
| FC27-05 | 8/474 | 5/8 | 3 | 0/3 | 3/474 | |
| FC27-06 | 9/474 | 6/9 | 3 | 2/5 | 5/474 | |
| FC27-07 | 9/474 | 3/9 | 6 | 2/8 | 8/474 | |
| FC27-08 | 30/474 | 18/30 | 12 | 3/15 | 15/474 | P*=0,001 |
| FC27-09 | 50/474 | 17/50 | 33 | 9/42 | 42/474 | |
| FC27-10 | 64/474 | 24/64 | 40 | 17/57 | 57/474 | |
| FC27-11 | 45/474 | 20/45 | 25 | 9/34 | 34/474 | |
| FC27-12 | 36/474 | 16/36 | 20 | 4/24 | 24/474 | P*=0,012 |
| FC27-13 | 23/474 | 14/23 | 9 | 6/15 | 15/474 | |
| FC27-14 | 18/474 | 7/18 | 11 | 9/20 | 20/474 | |
| FC27-15 | 15/474 | 6/15 | 9 | 6/15 | 15/474 | |
| FC27-16 | 27/474 | 16/27 | 11 | 3/14 | 14/474 | P*=0,004 |
| FC27-17 | 16/474 | 6/16 | 10 | 7/17 | 17/474 | |
| FC27-18 | 24/474 | 13/24 | 11 | 4/15 | 15/474 | P*=0,049 |
| FC27-19 | 21/474 | 11/21 | 10 | 4/14 | 14/474 | |
| FC27-20 | 30/474 | 15/30 | 15 | 5/20 | 20/474 | P*=0,041 |
| FC27-21 | 13/474 | 6/13 | 7 | 4/11 | 11/474 | |
| FC27-22 | 10/474 | 6/10 | 4 | 3/7 | 7/474 | |
| FC27-23 | 8/474 | 4/8 | 4 | 4/8 | 8/474 | |
| FC27-24 | 5/474 | 3/5 | 2 | 0/2 | 2/474 | |

Die Tabelle 12 zeigt die Prävalenz der 62 beobachteten Genotypen von *P. falciparum*, entsprechend der Allelfamilie (K1, Mad20, Ro33 und IC, FC27). Es wird die Prävalenz der Genotypen der peripher gewonnenen Isolate mit denen in plazentaren Isolaten statistisch verglichen. Hierzu wurde der McNemar-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Prävalenz einzelner Genotypen in den verschiedenen *P.-falciparum*-Isolaten wird durch den p*-Wert (McNemar) gekennzeichnet.

3.3.2 Vergleich des Infektionsmusters plazentar und peripher gewonnener Isolate

Da bestimmte Stämme von *P. falciparum* in der Plazenta sequestrieren, andere eher im Blutkreislauf der Schwangeren zirkulieren, wurde untersucht, ob eine Genotypisierung aus einem peripher gewonnenen Isolat einen Rückschluss auf das klonale Gesamtbild der *P.-falciparum*-Infektion bei schwangeren Frauen zulässt. Hierzu wurden die Infektionsprofile paralleler plazentar und peripherer Isolate miteinander verglichen.

Nur in 12% (n = 59) der Fälle spiegelte das Genotypisierungsmuster in einem peripheren Isolat das Gesamtbild der Infektion wider. Hier wurden identische Genotypen sowohl in den peripheren als auch in den plazentaren Isolaten nachgewiesen. Die Verteilungen der einzelnen Genotypen zeigt Abbildung 8. Ein Einfluss der Parasitendichten, des Alters der Patientin oder der Parität auf diese Verteilung wurde nicht beobachtet.

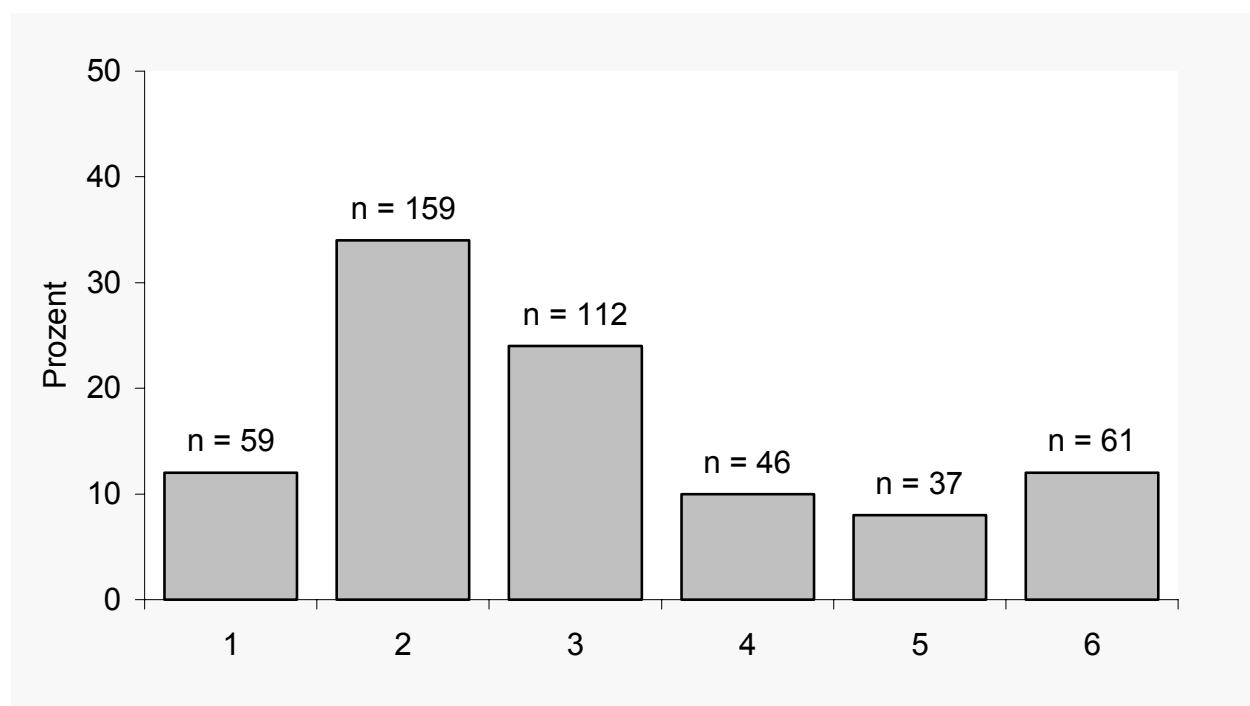


Abbildung 8: Verteilung der Genotypen in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten

- 1-peripher u. plazentar identische Genotypen
- 2-peripher u. plazentar identische Genotypen + peripher u. plazentar verschiedene Genotypen
- 3-peripher u. plazentar identische Genotypen + nur plazentar zusätzlich verschiedene Genotypen
- 4-peripher u. plazentar identische Genotypen + nur peripher zusätzlich verschiedene Genotypen
- 5-peripher u plazentar verschiedene Genotypen
- 6-nur plazentar Genotypen nachweisbar

In der Abbildung 8 sind nach Gruppen 1-6 die verschiedenen Verteilungen spezifischer Genotypen im peripheren und plazentaren Isolat dargestellt.

3.3.3 Einflussfaktoren auf die Prävalenz einzelner Genotypen von *P. falciparum*

Zur Analyse der Einflussfaktoren auf die Prävalenz einzelner Genotypen werden nur plazentar gewonnene Isolat verwendet, da diese eher die Erregerpopulation darstellen.

3.3.3.1 Wohnort der Patientinnen

Genotypen der fünf verschiedenen Allelfamilien von *msp-1* und *msp-2* sowie alle 62 Genotypen konnten bei Frauen aus der Stadt Agogo und bei Frauen der ländlichen Umgebung nachgewiesen werden. Jedoch wurden IC-12, FC27-16 und K1-09 signifikant häufiger in Agogo, Mad20-06 signifikant häufiger in der ländlichen Umgebung beobachtet (Tab. 13).

Tabelle 13: Prävalenz von IC-12, FC27-16, K1-10 und Mad20-06 im Bezug zum Wohnort

| | | Dörfer (n = 231) | | | Agogo (n = 242) | | χ^2 -Test |
|-----------|----------|------------------|------|--------|-----------------|--------|----------------|
| | | n | % | (n) | % | (n) | p-Wert |
| Genotypen | IC-12 | 57 | 8,7 | 20/231 | 15,3 | 37/242 | 0,027 |
| | FC27-16 | 27 | 2,2 | 5/231 | 9,1 | 22/242 | 0,001 |
| | K1-10 | 22 | 2,6 | 6/231 | 6,6 | 16/242 | 0,038 |
| | Mad20-06 | 55 | 14,7 | 34/231 | 8,7 | 21/242 | 0,040 |

3.3.3.2 Parität

Es wurde untersucht, ob einzelne Allelfamilien sowie spezifische Genotypen gehäuft bei Primiparae im Vergleich zu Multiparae auftraten. Eine derartige Assoziation konnte hier nicht nachgewiesen werden.

3.3.3.3 Alter der Patientinnen

Die Allelfamilien IC, K1, Mad20 und Ro33 traten unabhängig vom Alter der Gebärenden auf. Die Allelfamilie FC27 wurde signifikant häufiger bei Frauen mit einem Alter von unter 23 Jahren nachgewiesen. Die Mehrzahl aller Genotypen trat unabhängig vom Alter der Patientin in der gesamten Studiengruppe gleichmäßig verteilt auf. FC27-10, FC27-16, Mad20-06 und Mad20-08 wurden signifikant häufiger bei Patientinnen mit einem Alter von unter 23 Jahren beobachtet (Tab. 14).

Tabelle 14: Prävalenz von Mad20-06, Mad20-08, FC 27-10, FC 27-16 und der Allelfamilie FC27 in Bezug zum Alter der Patientin

| | | <23 Jahre | | 23-30 Jahre | | >30 Jahre | | χ^2 -Test |
|--------------|----------|-----------|---------|-------------|--------|-----------|-------|----------------|
| | | % | n | % | n | % | n | p-Wert |
| Allelfamilie | FC27 | 64,9 | 120/185 | 46,4 | 97/209 | 50,0 | 38/76 | 0,010 |
| Genotypen | FC27-10 | 16,8 | 31/185 | 14,8 | 31/209 | 3,9 | 3/76 | 0,011 |
| | FC27-16 | 9,7 | 18/185 | 3,3 | 7/209 | 7,4 | 2/27 | 0,021 |
| | Mad20-06 | 16,2 | 30/185 | 10,0 | 21/209 | 5,3 | 4/76 | 0,027 |
| | Mad20-08 | 4,3 | 8/185 | 1,0 | 2/209 | 0 | 0/76 | 0,010 |

3.3.3.4 Einnahme von antiparasitären Medikamenten (Pyrimethamin, Chloroquin)

Der antiparasitäre Medikamentenspiegel von Pyrimethamin und Chloroquin hatte bei den hier untersuchten Frauen keinen Einfluss auf die Prävalenz der Allelfamilien IC, FC27, K1, Mad20, Ro33. Die Prävalenz von K1-01, IC-14 und IC-15 war trotz nachgewiesenem Chloroquin signifikant höher. Der Genotyp IC-19 konnte überdurchschnittlich häufig bei Patientinnen mit einem Pyrimethaminspiegel im Vergleich zu Frauen ohne Pyrimethaminnachweis beobachtet werden (Tab.15).

Tabelle 15: Prävalenz von K1-01, IC-14, IC-15, IC-19 im Bezug zum Plasmaspiegel von Chloroquin (CLQ) bzw. Pyrimethamin (PYR)

| | | PYR-negativ (n = 283) | | PYR-positiv (n = 144) | | CLQ-negativ (n = 351) | | CLQ- positiv (n = 77) | | χ^2 -Test |
|-----------|-------|--------------------------|--------|--------------------------|-------|--------------------------|--------|--------------------------|-------|----------------|
| | | % | (n) | % | (n) | % | (n) | % | (n) | p-Wert |
| Genotypen | K1-01 | | | | | 0,9 | 3/351 | 3,9 | 3/77 | 0,040 |
| | IC-14 | | | | | 11,4 | 40/351 | 19,5 | 15/77 | 0,055 |
| | IC-15 | | | | | 2,0 | 7/351 | 9,0 | 7/77 | 0,002 |
| | IC-19 | 7,1 | 20/283 | 2,1 | 3/144 | | | | | 0,031 |

3.3.4 Effekte einer Infektion durch bestimmte Genotypen von *P. falciparum*

Es wurde untersucht, ob die plazentare Infektion einzelner Genotypen von *P. falciparum* mit einer bestimmten Manifestation oder bestimmten Schweregraden der Malaria assoziiert war. Hierzu wurden plazentare Infektionen durch Genotypen der Allelfamilien (K1, Mad20, Ro33 und IC, FC27) sowie die Infektion durch einzelne der 62 nachgewiesenen Genotypen in Bezug zu einer Anämie, einem verminderten Geburtsgewicht (LBW) sowie einer Frühgeburtlichkeit gebracht.

3.3.4.1 Mütterliche Anämie

Infektionen durch Genotypen der Allelfamilie FC27 gingen signifikant häufiger mit einer moderaten mütterlichen Anämie (Hb < 9 g/dl) einher. Ein signifikanter Einfluss auf die Prävalenz einer Anämie konnte für die Allelfamilien IC, K1, Mad20 und Ro33 nicht nachgewiesen werden. Bei Anwesenheit der Genotypen FC27-05, FC27-08, FC27-14, FC27-19 oder FC27-20 wurde signifikant häufiger eine moderate Anämie beobachtet (Tab. 16).

Tabelle 16: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC27 und einzelner Genotypen mit einer Anämie

| | | Hb ≥ 9 g/dl | | Hb < 9 g/dl | | χ ² -Test |
|--------------|---------|-------------|---------|-------------|-------|----------------------|
| | | % | (n) | % | (n) | p-Wert |
| Allelfamilie | FC27 | 52 | 215/413 | 67 | 39/58 | 0,03 |
| Genotypen | FC27-05 | 1 | 4/413 | 7 | 4/58 | 0,001 |
| | FC27-08 | 5 | 21/413 | 14 | 8/58 | 0,01 |
| | FC27-14 | 5 | 19/413 | 14 | 8/58 | 0,005 |
| | FC27-19 | 4 | 15/413 | 10 | 6/58 | 0,02 |
| | FC27-20 | 5 | 22/413 | 12 | 7/58 | 0,045 |

3.3.4.2 Vermindertes Geburtsgewicht (LBW)

Ein vermindertes Geburtsgewicht des Neugeborenen trat ebenfalls signifikant häufiger bei Nachweis der Allelfamilie FC27 auf. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang für die Allelfamilien IC, K1, Mad20 und Ro33. Bei Nachweis von FC27-08, FC27-12, FC27-19 bzw. FC27-21 wurde signifikant häufiger ein vermindertes Geburtsgewicht des Neugeborenen beobachtet (Tab. 17).

Tabelle 17: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC27 und einzelner Genotypen mit einem LBW

| | | Kein LBW | | LBW | | χ^2 -Test |
|--------------|---------|----------|---------|-----|--------|----------------|
| | | % | (n) | % | (n) | p-Wert |
| Allelfamilie | FC27 | 50 | 179/356 | 63 | 63/100 | 0,024 |
| Genotypen | FC27-08 | 5 | 18/356 | 11 | 11/100 | 0,031 |
| | FC27-12 | 4 | 15/356 | 12 | 12/100 | 0,004 |
| | FC27-19 | 3 | 11/356 | 9 | 9/100 | 0,011 |

3.3.4.3 Frühgeburtslichkeit

Eine Frühgeburt trat ebenfalls signifikant häufiger ausschließlich bei einer Infektionen durch Genotypen der Allelfamilie FC27 auf. Außerdem konnte signifikant häufiger eine Frühgeburt bei Infektion durch die Genotypen FC27-10 und FC27-21 beobachtet werden (Tab.18).

Tabelle 18: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC 27 und einzelner Genotypen mit einer Frühgeburt

| | | Keine Frühgeburt | | Frühgeburt | | χ^2 -Test |
|--------------|---------|------------------|---------|------------|-------|----------------|
| | | % | (n) | % | (n) | p-Wert |
| Allelfamilie | FC27 | 50 | 179/358 | 69 | 52/75 | 0,002 |
| Genotypen | FC27-10 | 11 | 40/358 | 21 | 16/75 | 0,017 |
| | FC27-21 | 2 | 6/358 | 5 | 4/75 | 0,05 |

3.4 Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum*

3.4.1 Multiplizität der Infektion plazentar und peripher gewonnener Isolate

Von den 474 plazentar gewonnenen *P.-falciparum*-Isolaten waren 81% (n = 384) polyklonal, 19% (n = 90) monoklonal. Die Multiplizität der Infektion plazentarer Isolate lag in der gesamten Studiengruppe bei 2,91 (Bereich 1-9, Abb. 9). Von den Frauen mit einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion konnte bei 12,2% (n = 58) keine Infektion in einer peripheren Blutprobe nachgewiesen werden. 24,7% (n = 117) der Untersuchungsgruppe hatten in den peripher gewonnenen Isolaten monoklonale *P.-falciparum*-Infektionen. Bei 63% (n = 299) konnten polyklonale *P.-falciparum*-Infektionen im peripher gewonnenen Isolat beobachtet werden. Die Multiplizität der Infektion bei Patientinnen, bei denen peripher eine Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen wurde, lag bei 2,59 (Bereich 1-7, Abb. 9) und war damit signifikant niedriger als die Multiplizität der Infektion plazentarer Isolate ($p < 0,0001$). Die Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Anzahl von *P.-falciparum*-Genotypen in plazentaren und peripheren *P.-falciparum*-Isolaten.

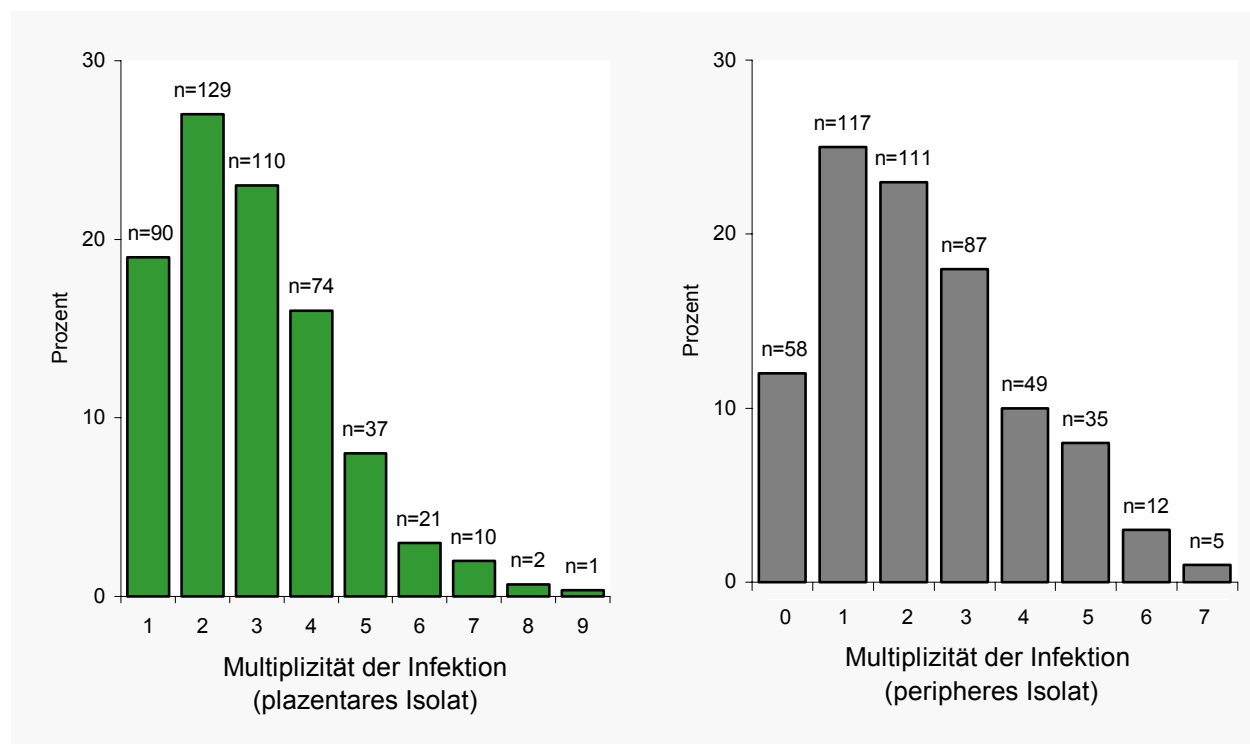


Abbildung 9: Anzahl an *P.-falciparum*-Genotypen in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten

Dargestellt ist die Prävalenz von plazentaren und peripheren Infektionen mit 1-9 Genotypen von *P. falciparum*. (0 = keine nachweisbare Infektion in der peripheren Blutprobe).

3.4.2 Korrelation der Multiplizität der Infektion peripher und plazentar gewonnener Isolate

Die Multiplizität der Infektion plazentarer Isolate korrelierte signifikant mit der Multiplizität der Infektion peripherer Isolate ($r = 0,54$; $p < 0,001$). Diese positive Korrelation war unabhängig vom Alter, der Parität sowie unabhängig von den Parasitendichten der Infektionen. In diese Analyse wurden ausschließlich Patientinnen einbezogen, bei denen in beiden Isolaten eine *P. falciparum*- Infektion nachgewiesen wurde ($n = 416$).

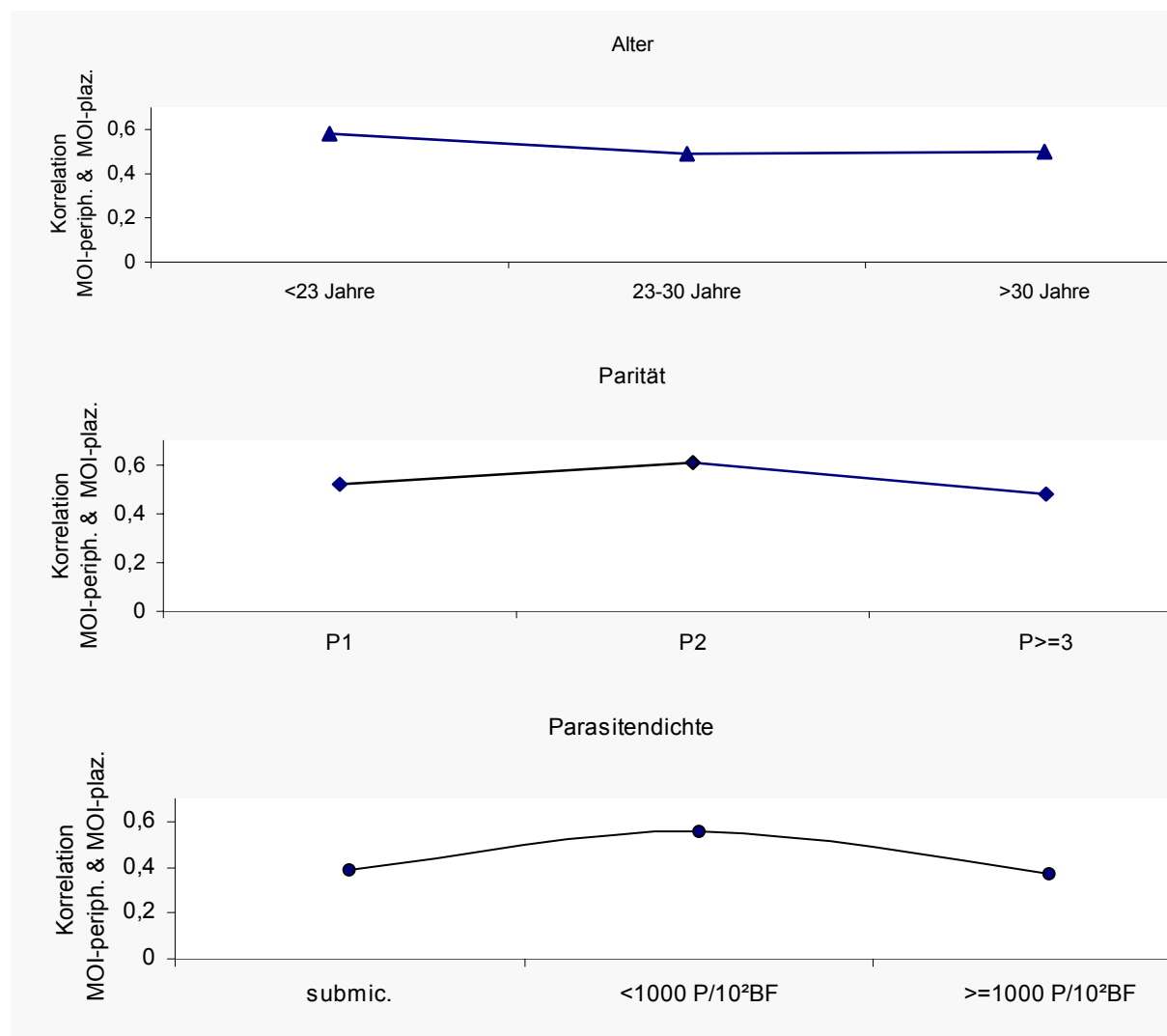


Abbildung 10: Korrelation der Multiplizität der Infektion peripher und plazentar gewonnener Isolate in Bezug zum Alter, der Parität und der plazentaren Parasitendichte

Dargestellt ist die Korrelation (Spearman) der Multiplizität der Infektion peripherer und plazentarer Isolate in Bezug zum Alter (< 23 Jahre, 23-30 Jahre, > 30 Jahre) der Parität (P1 = Parae 1, P2 = Parae 2, P ≥ 3 = Parae ≥ 3, und der plazentaren Parasitendichte (submic., < 1000 P/10²BF, ≥ 1000 P/10²BF); MOI-plaz. = Multiplizität der Infektion (plazentares Isolat), MOI-periph. = Multiplizität der Infektion (peripheres Isolat).

3.4.3 Einflussfaktoren auf die Multiplizität der Infektion

Zur Untersuchungen von Einflussfaktoren auf die Multiplizität der Infektion peripher gewonnener Isolate wurden nur Proben mit einem positiven Ergebnis verwendet (n=416).

3.4.3.1 Parasitendichten der Infektion

Sowohl im peripher als auch im plazentar gewonnenen Isolat stieg das geometrische Mittel der Parasitendichte signifikant mit steigender Multiplizität der Infektion (Tab. 19 und 20).

Tabelle 19: Abhängigkeit der plazentaren Parasitendichte von der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat)

| Multiplizität der Infektion | n | GMPD / (P/10 ² BF) | p-Wert |
|-----------------------------|-----|-------------------------------|--------|
| 1 | 89 | 16,76 | <0,001 |
| 2-3 | 234 | 18,78 | |
| 4-5 | 108 | 72,26 | |
| >5 | 33 | 88,70 | |
| total | 464 | 28,08 | |

Dargestellt sind plazentar nachgewiesene Infektionen mit 1, 2-3, 4-5 oder mehr als 5 Genotypen von *P. falciparum* im Bezug zum geometrischen Mittel der plazentaren Parasitendichten (GMPD). (P/10²PF = Parasiten / 100 Blickfelder), p-Werte des Jonckheere-Terpstra-Test.

Tabelle 20: Abhängigkeit der peripheren Parasitendichte von der Multiplizität der Infektion (perip. Isolat)

| Multiplizität der Infektion | n | GMPD / (P/μl) | p-Wert |
|-----------------------------|-----|---------------|--------|
| 1 | 114 | 6,15 | <0,001 |
| 2-3 | 196 | 15,23 | |
| 4-5 | 82 | 38,32 | |
| >5 | 17 | 212,35 | |
| total | 409 | 15,67 | |

Dargestellt sind peripher nachgewiesene Infektionen mit 1, 2-3, 4-5 oder mehr als 5 Genotypen von *P. falciparum* im Bezug zum geometrischen Mittel der peripheren Parasitendichten (GMPD), P/μl (Parasiten/ Mikroliter), p-Werte des Jonckheere-Terpstra-Test.

3.4.3.2 Stadien der plazentaren Infektion

Es sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang der Multiplizität der Infektion plazentar gewonnener Isolate und der Aktivität einer *P.-falciparum*-Infektion in der Plazenta gibt. Dazu wurde die Multiplizität der Infektion in Relation zu den plazentaren Infektionstypen nach Bulmer gebracht (Bulmer *et al.* 1993). Ein signifikanter Unterschied der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) konnte zwischen abgelaufenen chronischen Infektionen und akuten und akut-chronischen Infektionen nachgewiesen werden (p-Wert [Kruskal-Wallis-Test] < 0,001). Die Multiplizität der akut-chronischen Infektionen und akuten Infektionen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 11).

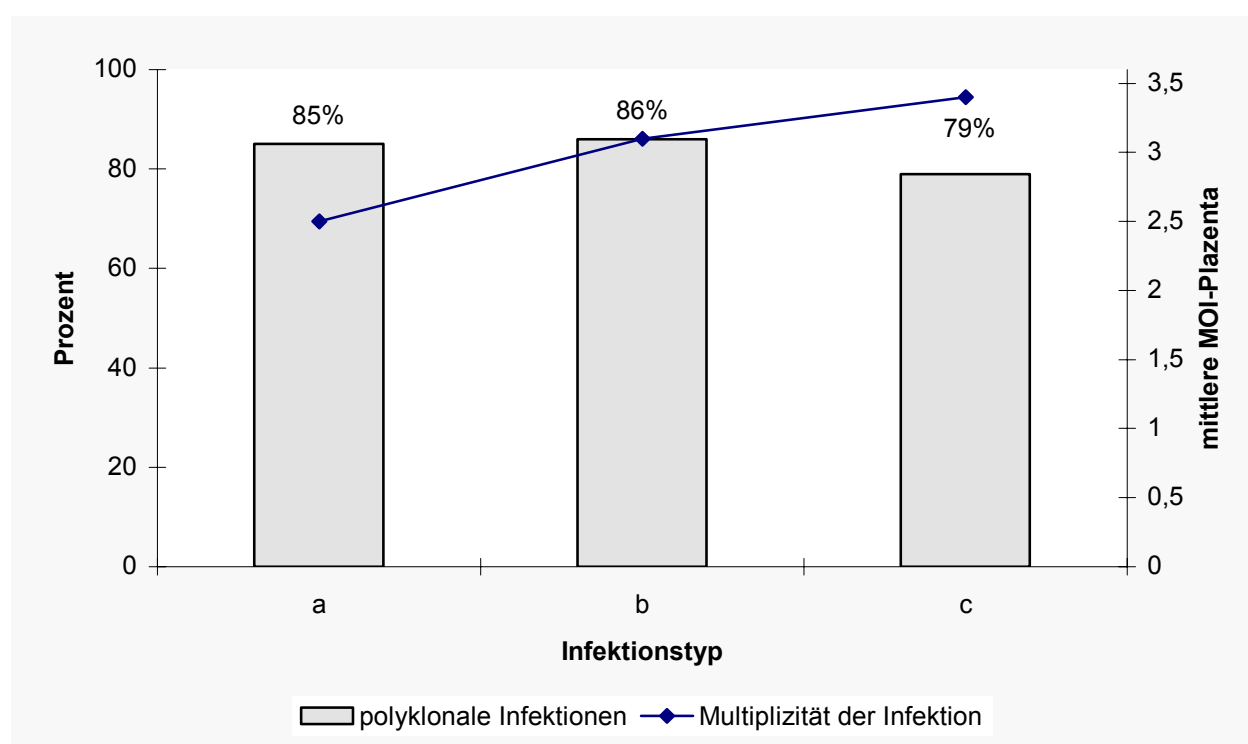


Abbildung 11: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zum Stadium der plazentaren *P.-falciparum*-Infektion

a) abgelaufene chronische Infektion b) aktiv-chronische Infektion c) aktive Infektion
Dargestellt ist der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und der prozentuale Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zum Infektionstyp nach Bulmer der plazentaren Infektion von *P. falciparum*.

3.4.3.3 Alter der Patientin

Die Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) fiel signifikant mit zunehmenden Alter der Patientin (p-Wert [Kruskal-Wallis-Test] = 0,006). Die Analysen des peripheren Isolates zeigten ein ähnliches Bild: Es konnte ebenfalls ein signifikantes Abfallen der Multiplizität der Infektion mit dem Alter der Patientin beobachtet werden (p-Wert [Kruskal-Wallis-Test] < 0,005). Außerdem fiel der Anteil an polyklonalen Infektionen mit dem Alter (p-Wert [Chi²trend-Test] = 0,008) (Tab. 21 und 22).

Tabelle 21: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und Anteil polyklonaler plazentarer Infektionen

| Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|--|-----|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| Alter | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| total | 470 | 2,92 | (1-9) | 0,006 | 81 | 0,08 |
| <23 | 185 | 3,19 | (1-9) | | 86 | |
| 23-30 | 209 | 2,80 | (1-8) | | 76 | |
| >30 | 76 | 2,58 | (1-6) | | 79 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

Tabelle 22: Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) und Anteil polyklonaler peripherer Infektionen

| Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|--|-----|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| Alter | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| total | 416 | 2,59 | (1-7) | 0,005 | 72 | 0,008 |
| <23 | 169 | 2,86 | (1-7) | | 78 | |
| 23-30 | 184 | 2,46 | (1-7) | | 69 | |
| >30 | 60 | 2,25 | (1-7) | | 62 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

Parität

Die Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) fiel signifikant mit steigender Parität. Ein Einfluss der Parität auf die Prävalenz einer polyklonalen Infektion der Plazenta konnte nicht beobachtet werden. Die Analysen des peripheren Isolates zeigten eine signifikante Abnahme der Multiplizität der Infektion mit steigender Parität. Hier nahm ebenfalls die Prävalenz einer polyklonalen Infektion signifikant mit der Parität ab (Tab. 23 und 24).

Tabelle 23: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität

| Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|--|-----|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| Parität | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| Total | 474 | 2,91 | (1-9) | 0,034 | 81 | 0,12 |
| 1 | 194 | 3,11 | (1-9) | | 84 | |
| 2 | 116 | 3,02 | (1-8) | | 81 | |
| 3 | 63 | 2,73 | (1-6) | | 79 | |
| >3 | 101 | 2,52 | (1-6) | | 76 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

Tabelle 24: Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität

| Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|--|-----|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| Alter | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| total | 416 | 2,59 | (1-7) | 0,003 | 72 | 0,025 |
| 1 | 175 | 2,88 | (1-7) | | 77 | |
| 2 | 101 | 2,59 | (1,7) | | 72 | |
| 3 | 52 | 2,21 | (1-6) | | 63 | |
| >3 | 88 | 2,24 | (1-7) | | 65 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

Parität und Parasitendichten

3.4.3.3.1 Plazentar gewonnene Isolate

Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Parasitendichten der Infektion und Multiplizität der Infektion beobachtet (siehe Kapitel 3.4.3.1.). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Multiplizität der Infektion und Parität beobachtet. Um den direkten Einfluss der Parität auf die Multiplizität der Infektion zu untersuchen, wurde hier der Zusammenhang zwischen der Multiplizität der Infektion und der Parität in Verbindung zur Parasitendichte untersucht. Hierzu wurde die Gesamtstudiengruppe in die Gruppen submikroskopische plazentare Infektionen ($n = 181$), Infektionen mit plazentaren Parasitendichten von $1-10^3$ P/10² BF ($n = 237$) und Infektionen mit plazentaren Parasitendichten von größer 10^3 P/10² BF eingeteilt. Die zuvor beschriebene Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion von der Parität konnte nach dieser Stratifizierung nicht mehr nachgewiesen werden (Tab.25).

Tabelle 25: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität, getrennt nach Gruppen verschiedener Parasitendichten

| Gruppen | Multiplizität der Infektion (plazentares Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|---------------------------------------|--|-----|------|---------|---------|---------------------------------|--------|
| | Parität | n | MOI | Bereich | °p-Wert | % | p-Wert |
| submic | total | 181 | 2,36 | (1-7) | 0,5 | 74 | 0,5 |
| | 1 | 48 | 2,58 | (1-7) | | 81 | |
| | 2 | 42 | 2,40 | (1-6) | | 69 | |
| | 3 | 31 | 2,26 | (1-6) | | 77 | |
| | >3 | 60 | 2,22 | (1-6) | | 70 | |
| <10 ³ P/10 ² BF | total | 237 | 3,19 | (1-9) | 0,5 | 85 | 0,3 |
| | 1 | 114 | 3,24 | (1-9) | | 83 | |
| | 2 | 60 | 3,35 | (1-8) | | 92 | |
| | 3 | 26 | 3,19 | (1-6) | | 77 | |
| | >3 | 37 | 2,81 | (1-6) | | 84 | |
| >10 ³ P/10 ² BF | total | 46 | 3,50 | (1-7) | 0,5 | 87 | 0,4 |
| | 1 | 26 | 3,35 | (1-7) | | 89 | |
| | 2 | 12 | 3,67 | (1-6) | | 75 | |
| | 3 | 4 | 3,00 | (2-5) | | 100 | |
| | >3 | 4 | 4,50 | (3-6) | | 100 | |

Gruppen verschiedener Parasitendichten: submic = submikroskopische Infektion; < 10³ P/10²BF = Infektionen mit Parasitendichten < 10³ P/10²BF; > 10³ P/10²BF = Infektionen mit Parasitendichten > 10³ P/10²BF; MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

3.4.3.3.2 Peripher gewonnene Isolate

Zur Darstellung des Zusammenhangs der Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) und der Parität in Bezug zu peripheren Parasitendichten wurden wie zuvor für plazentare Infektionen die peripher nachgewiesenen Infektionen in Gruppen verschiedener Parasitendichten eingeteilt. Auch hier konnte der zuvor beschriebene Zusammenhang der Multiplizität der Infektion für die einzelnen Strata nicht nachgewiesen werden. Der Anteil polyklonaler peripherer Infektionen stieg signifikant mit den Parasitendichten, die Parität hatte unabhängig von der Parasitendichte keinen Einfluss auf den Anteil polyklonaler Infektionen (Tab. 26).

Tabelle 26: Multiplizität der peripheren Infektion sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität, getrennt nach Gruppen verschiedener Parasitendichten

| Gruppen | Multiplizität der Infektion (peripheres Isolat) | | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|-------------------------|---|-----|------|---------|---------|---------------------------------|--------|
| | Parität | n | MOI | Bereich | °p-Wert | % | p-Wert |
| submic | total | 317 | 1,86 | (0-7) | 0,4 | 64 | 0,3 |
| | 1 | 110 | 2,00 | (0-7) | | 70 | |
| | 2 | 83 | 1,94 | (0-6) | | 65 | |
| | 3 | 45 | 1,71 | (0-5) | | 56 | |
| | >3 | 79 | 1,66 | (0-5) | | 60 | |
| <10 ³ P / µl | total | 117 | 2,91 | (0-7) | 0,2 | 80 | 0,8 |
| | 1 | 55 | 3,07 | (0-6) | | 77 | |
| | 2 | 26 | 2,92 | (0-7) | | 84 | |
| | 3 | 15 | 2,07 | (0-6) | | 77 | |
| | >3 | 21 | 3,05 | (0-7) | | 85 | |
| ≥10 ³ P / µl | total | 34 | 3,68 | (2-7) | 0,4 | 100 | -- |
| | 1 | 26 | 3,81 | (2-7) | | 100 | |
| | 2 | 5 | 3,80 | (2-5) | | 100 | |
| | 3 | 2 | 2,50 | (2-3) | | 100 | |
| | >3 | 1 | 2,00 | (2-2) | | 100 | |

Gruppen verschiedener Parasitendichten: submic = submikroskopische Infektion; < 10³ P/mcl = Infektionen mit Parasitendichten < 10³ P/mcl; ≥ 10³ P/µl = Infektionen mit Parasitendichten ≥ 10³ P/µl; MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²trend-Test).

3.4.3.3.3 Korrelation von Multiplizität der Infektion und Parasitendichte in Bezug zur Parität

Ein möglicher Einfluss der Parität auf die zuvor beschriebene Korrelation zwischen Multiplizität der Infektion und Parasitendichte wurde untersucht. Prinzipiell lag die Korrelation von Multiplizität und Parasitendichte ($r = 0,21$) im plazentaren Isolat unter der Korrelation im peripheren Isolat ($r = 0,30$).

Besonders im plazentaren Isolat fällt die Korrelation mit der Parität (Abb.11).

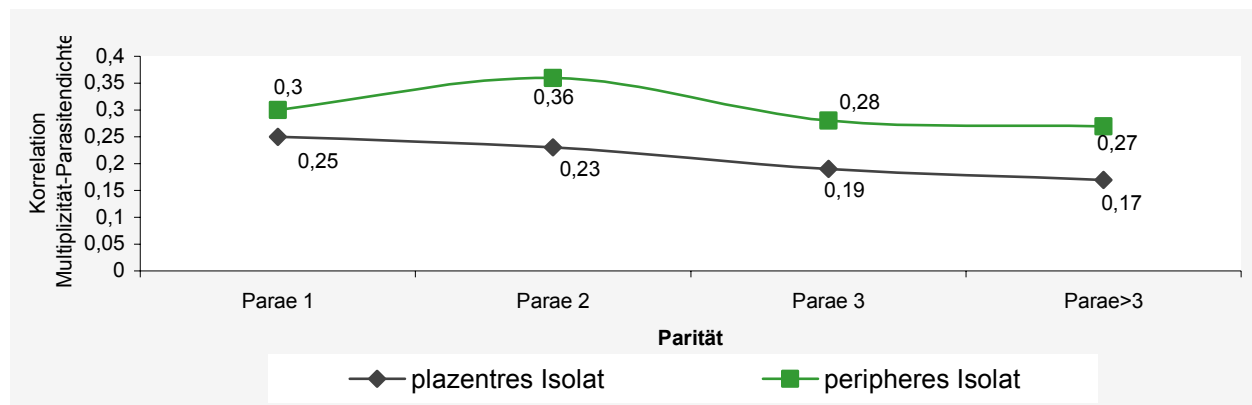


Abbildung 12: Korrelation von Multiplizität der Infektion und Parasitendichten in Bezug zur Parität

3.4.3.4 Wohnort

Da die Einflüsse verschiedener Größen auf die Multiplizität der Infektion plazentar und peripher gewonnener Isolate gleichgerichtet waren, werden die folgenden Analysen nur mit der Multiplizität der Infektion plazentarer Isolate durchgeführt ($n = 474$).

Ein signifikanter Unterschied der Multiplizität der Infektion zwischen Patientinnen der Stadt Agogo und den umliegenden Dörfern konnte nicht festgestellt werden (Tab.27).

Tabelle 27: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zum Wohnort der Patientin

| Wohnort | Multiplizität der Infektion | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|---------|-----------------------------|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| Agogo | 242 | 2,86 | (1-9) | 0,28 | 79 | 0,35 |
| Dörfer | 231 | 2,97 | (1-8) | | 83 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²-Test).

3.4.3.5 Saison

Die Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) war signifikant höher bei Frauen, die im Vergleich zur späten Trockenzeit in der Regenzeit bzw. der frühen Trockenzeit entbanden (p-Wert [Mann-Whitney-Test] = 0,006). Der Anteil polyklonaler Infektionen war bei diesen Frauen um 9% höher (p-Wert (Chi²-Test) = 0,04 (Tab. 28).

Tabelle 28: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Regen- bzw. Trockenzeit

| Alter | Multiplizität der Infektion | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|----------------|-----------------------------|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| TZ (spät) | 95 | 2,47 | (1-6) | 0,006 | 74 | 0,04 |
| RZ / TZ (früh) | 379 | 3,03 | (1-9) | | 83 | |

MOI = Mittelwert der Multiplizität der Infektion; °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²-Test); RZ = Regenzeit; TZ = Trockenzeit

3.4.3.6 Antiparasitäre Medikamente (Chloroquin, Pyrimethamin)

Ein signifikanter Einfluss von Chloroquin auf die Multiplizität der Infektion konnte nicht nachgewiesen werden. Dem gegenüber war die Multiplizität der Infektion signifikant niedriger bei Nachweis von Pyrimethamin im Plasma (p-Wert [Mann-Whitney-Test] = 0,009) (Tab. 29).

Tabelle 29: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Einnahme von Chloroquin und Pyrimethamin

| Medikamenten-Nachweis | | Multiplizität der Infektion | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | |
|-----------------------|------|-----------------------------|------|-----------|---------|---------------------------------|--------|
| | | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| CLQ | Nein | 351 | 2,91 | (1-9) | 0,7 | 81 | 0,7 |
| | Ja | 77 | 2,95 | (1-8) | | 83 | |
| PYR | Nein | 283 | 3,06 | (1-9) | 0,009 | 84 | 0,05 |
| | Ja | 144 | 2,64 | (1-7) | | 76 | |

MOI = Multiplizität der plazentaren Infektion, °p-Wert (Kruskal-Wallis-Test); p-Wert (Chi²-Test).

3.4.4 Assoziation zwischen Multiplizität und klinischer Manifestation der Malaria

3.4.4.1 Anämie

Eine hohe Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) war in univariater Analyse mit einer moderaten Anämie (Hb < 9 g/dl) assoziiert. Eine Anämie mit Hb < 11 g/dl zeigte keine Abhängigkeit von der Multiplizität bzw. der Polyklonalität der plazentaren Infektion (Tab. 30).

Tabelle 30: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einer Anämie

| Hb | Anämie | Multiplizität der Infektion | | | Anteil polyklonaler Infektionen | | |
|---------|--------|-----------------------------|------|-----------|---------------------------------|----|--------|
| | | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| <11g/dl | Nein | 254 | 2,90 | (1-9) | 0,6 | 80 | 0,6 |
| | Ja | 217 | 2,93 | (1-7) | | 82 | |
| <9g/dl | Nein | 413 | 2,86 | (1-9) | 0,04 | 80 | 0,3 |
| | Ja | 58 | 3,26 | (1-7) | | 86 | |

MOI = Multiplizität der plazentaren Infektion; Hb = Hb-Gehalt, °p-Wert (Mann-Withney-Test), p-Wert (Chi²-Test).

3.4.4.2 Frühgeburtlichkeit

Eine hohe Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) war in univariater Analyse mit einer Frühgeburtlichkeit assoziiert (Tab. 31). Nach Trennung der Gesamtgruppe in Patientinnen mit mikroskopisch nachweisbaren bzw. submikroskopischen plazentaren Infektionen sowie in Primiparae und Multiparae konnte innerhalb der Gruppe submikroskopischer Infektionen ebenfalls eine solche signifikante Assoziation nachgewiesen werden. Die Assoziation der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) mit Frühgeburtlichkeit war bei Primiparae im Vergleich zur gesamten Studiengruppe weitgehend stabil (p-Wert [Mann-Whitney-Test] = 0,049). Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Assoziation für Multiparae beobachtet werden (Tab. 31).

Tabelle 31: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einer Frühgeburtlichkeit

| Gruppen | n | Multiplizität der Infektion | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | | |
|----------|-----|-----------------------------|-----|------|-----------|---------------------------------|----|--------|
| | | PPM | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| gesamt | 433 | Nein | 358 | 2,83 | (1-9) | 0,030 | 78 | 0,005 |
| | | Ja | 75 | 3,20 | (1-7) | | 92 | |
| submic | 167 | Nein | 140 | 2,21 | (1-6) | 0,004 | 70 | 0,015 |
| | | Ja | 27 | 3,00 | (1-7) | | 93 | |
| mic | 257 | Nein | 211 | 3,22 | (1-9) | 0,7 | 10 | 0,1 |
| | | Ja | 46 | 3,28 | (1-7) | | 19 | |
| Parae 1 | 178 | Nein | 131 | 2,96 | (1-9) | 0,049 | 77 | 0,004 |
| | | Ja | 47 | 3,36 | (1-7) | | 96 | |
| Parae >1 | 255 | Nein | 227 | 2,75 | (1-8) | 0,4 | 78 | 0,3 |
| | | Ja | 28 | 2,93 | (1-6) | | 86 | |

MOI (Multiplizität der Infektion), PPM (Partus praematurus = Frühgeburtlichkeit); °p-Wert (Mann-Whitney-Test); p-Wert Chi²-Test; gesamt (gesamte Studiengruppe); submic [Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen]; mic (Patientinnen mit mikroskopischen plazentaren Infektionen); Parae 1 (Primiparae); Parae > 1 (Multiparae).

3.4.4.3 Vermindertes Geburtsgewicht

Eine hohe Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) war in univariater Analyse mit einem verminderten Geburtsgewicht assoziiert (Tab. 32). Eine solche signifikante Assoziation bestand ebenfalls für die Gruppe der Frauen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen. Nach Stratifizierung bestand nur noch bei Primiparae ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Multiplizität der Infektion und einem verminderten Geburtsgewicht (Tab. 32).

Tabelle 32: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einem LBW

| Gruppen | n | Multiplizität der Infektion | | | | Anteil polyklonaler Infektionen | | |
|---------|-----|-----------------------------|-----|------|-----------|---------------------------------|----|--------|
| | | LBW | n | MOI | (Bereich) | °p-Wert | % | p-Wert |
| gesamt | 447 | Nein | 348 | 2,82 | (1-9) | 0,03 | 78 | 0,009 |
| | | Ja | 99 | 3,12 | (1-7) | | 90 | |
| submic | 175 | Nein | 141 | 2,25 | (1-6) | 0,02 | 71 | 0,04 |
| | | Ja | 34 | 2,85 | (1-7) | | 88 | |
| mic | 272 | Nein | 207 | 3,22 | (1-9) | 0,6 | 15 | 0,1 |
| | | Ja | 65 | 65 | (1-7) | | 26 | |
| Parae 1 | 186 | Nein | 124 | 3,02 | (1-9) | 0,2 | 78 | 0,02 |
| | | Ja | 62 | 3,23 | (1-7) | | 92 | |
| Parae>1 | 270 | Nein | 232 | 2,74 | (1-8) | 0,2 | 78 | 0,2 |
| | | Ja | 38 | 2,97 | (1-6) | | 87 | |

MOI (Multiplizität der plazentaren Infektion), LBW = < 2500g; °p-Wert (Mann-Withney-Test); p-Wert (Chi²-Test); gesamt (gesamte Studiengruppe); submic (Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen); mic (Patientinnen mit mikroskopischen plazentaren Infektionen); Parae 1 (Primiparae); Parae > 1 (Multiparae).

3.5 Multivariate Analyse der Einflussfaktoren eine Anämie

Zur getrennten unabhängigen Untersuchung aller Risikofaktoren, die ursächlich für eine Anämie waren, wurde ein logistisches Regressionsmodell erstellt. In diese multivariate Analyse wurden nur Variablen, die in univariater Analyse eine signifikante Assoziation zeigten, aufgenommen.

So konnte in multivariater Analyse kein Einfluss der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) auf eine moderate Anämie ($Hb < 9\text{g/dl}$) nachgewiesen werden. Hauptrisikofaktor für eine Anämie war die Parasitendichte der Infektion. So hatten Patientinnen mit plazentaren Parasitendichten von mehr als $1000\text{ P}/10^2\text{ BF}$ im Vergleich zu Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen ein ca. drei mal höheres Risiko für eine Anämie. Tendenziell hatten Multiparae ein geringeres Risiko für eine Anämie als Primiparae. Die Allelfamilie FC27 war in multivariater Analyse nicht mit einer Anämie assoziiert. Jedoch bestätigte sich eine Assoziation für die Genotypen FC27-05, FC27-08 (Tab. 33).

3.6 Multivariate Analyse der Einflussfaktoren für Frühgeburtlichkeit

In weiteren logistischen Regressionsmodellen wurden unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten einer Frühgeburtlichkeit ermittelt. Dabei zeigte sich, dass Patientinnen mit einer moderaten Anämie ($Hb < 9\text{ g/dl}$) ein durchschnittlich doppelt so hohes Risiko für eine Frühgeburtlichkeit aufwiesen im Vergleich zu Patientinnen ohne eine moderate Anämie. Weitere Risikofaktoren waren eine niedrige Parität, eine hohe Multiplizität der Infektion sowie die Infektion mit Genotypen der Allelfamilie FC27. Nicht assoziiert waren in multivariater Analyse die Parasitendichte und einzelne Genotypen von *P. falciparum* (Tab. 34-37). Bei Auftrennung der Gesamtgruppe in Primiparae und Multiparae fiel auf, dass Primiparae bei Infektionen von zwei Stämmen ein fast 10 mal höheres Risiko für eine Frühgeburtlichkeit hatten, als Primiparae mit monoklonalen Infektionen. Bei Infektionen mit drei oder mehr Genotypen war das Risiko um den Faktor 12,6 erhöht. Ein weiterer Risikofaktor für das Vorliegen einer Frühgeburtlichkeit war bei Primiparae die plazentare Infektion von Genotypen der Allelfamilie FC27. Die Tabellen 34-37 zeigen die logistischen Regressionsmodelle von Risikofaktoren für Frühgeburtlichkeit für die gesamte Studiengruppe, für Primiparae und Multiparae bzw. für Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen.

3.7 Multivariate Analyse der Einflussfaktoren für ein LBW

In multivariater Analyse wurden Risikofaktoren für das Vorliegen eines verminderten Geburtsgewichts untersucht. Frühgeborene wiesen ca. 9 mal häufiger ein vermindertes Geburtsgewicht auf, als termingerecht geborene Kinder (Tab. 38). Außerdem hatten Kinder von

Müttern mit einer moderaten Anämie ($Hb < 9 \text{ g/dl}$) im Vergleich zu Neugeborenen von Müttern ohne eine derartige Anämie ein mehr als doppelt so hohes Risiko für ein vermindertes Geburtsgewicht. Dieser Einflussfaktor war unabhängig von der Parität der Patientin. Im Vergleich hatten Primiparae das höchste Risiko für ein vermindertes Geburtsgewicht. Bei späteren Schwangerschaften lag das Risiko im Vergleich zu Primiparae zwischen 0,3 und 0,4. Der Einfluss der Parasitendichte war im Vergleich zu submikroskopischen Infektionen nicht signifikant.

In multivariater Analyse konnte der in univariater Analyse beobachtete Einfluss der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) auf ein vermindertes Geburtsgewicht nicht festgestellt werden. Ebenso konnte keine Assoziation von Genotypen der Allelfamilie FC27 bzw. einzelner Genotypen mit einem vermindertem Geburtsgewicht beobachtet werden. Die Tabellen 38 bis 40 zeigen die logistischen Regressionsmodelle von Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichtes für die gesamte Studiengruppe, für Primiparae und Multiparae.

Tabelle 33: Risikofaktoren für das Vorliegen einer Anämie (Hb < 9 g/dl)

| | (n) | % Hb <9 g/dl | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert |
|--|-----|-----------------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 349 | 12 | 1 | 0,3 | | |
| ja | 76 | 16 | 1,5 [0,7-2,9] | | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 280 | 13 | 1 | 0,4 | | |
| ja | 144 | 10 | 0,7 [0,4-1,4] | | | |
| Parität | | | | | | |
| P1 | 192 | 16 | 1 | | | |
| P2 | 115 | 10 | 0,6 [0,3-1,2] | 0,2 | | |
| P3 | 63 | 10 | 0,5 [0,2-1,4] | 0,2 | | |
| P≥4 | 101 | 9 | 0,5 [0,2-1,1] | 0,09 | | |
| Parasitendichte (Plazenta) | | | | | | |
| submic. | 180 | 8 | 1 | | 1 | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 235 | 13 | 1,8 [0,9-3,5] | 0,08 | 1,6 [0,7-3,5] | 0,2 |
| >10 ³ P/10 ² BF | 46 | 26 | 4,2 [1,8-9,8] | 0,001 | 3,1 [1,5-10,2] | 0,006 |
| MOI (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 90 | 9 | 1 | | | |
| 2 Stämme | 128 | 8 | 0,9 [0,3-2,3] | 0,8 | | |
| ≥ 3 Stämme | 253 | 16 | 1,9 [0,9-4,3] | 0,1 | | |
| Allelfamilie FC27 | | | | | | |
| nein | 217 | 9 | 1 | | | |
| ja | 254 | 15 | 1,9 [1,1-3,4] | 0,03 | | |
| FC27-05 | | | | | | |
| nein | 463 | 12 | 1 | | 1 | |
| ja | 8 | 100 | 7,5 [1,8-31,2] | 0,001 | 9,6 [1,5-59,0] | 0,02 |
| FC27-08 | | | | | | |
| nein | 442 | 11 | 1 | | 1 | |
| ja | 29 | 28 | 3,0 [1,2-7,1] | 0,01 | 3,0 [1,1-8,1] | 0,03 |
| FC27-14 | | | | | | |
| nein | 444 | 11 | 1 | | | |
| ja | 27 | 30 | 3,3 [1,4-8,0] | 0,005 | | |
| FC27-19 | | | | | | |
| nein | 450 | 12 | 1 | | | |
| ja | 21 | 29 | 3,1 [1,1-8,2] | 0,02 | | |
| FC27-20 | | | | | | |
| nein | 442 | 12 | 1 | | | |
| ja | 29 | 24 | 2,4 [1,0-6,0] | 0,04 | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-05, FC27-08, FC27-14, FC27-19, FC27-20, die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-05, FC27-08, FC27-14, FC27-19, FC27-20 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-05, FC27-08, FC27-14, FC27-19, FC27-20 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 34: Risikofaktoren einer Frühgeburtslichkeit (gesamte Studiengruppe)

| | (n) | % Frühgeburts | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p |
|--|-----|------------------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| Anämie (Hb < 9g/dl) | | | | | | |
| nein | 381 | 16 | 1 | | 1 | |
| ja | 50 | 32 | 2,5 [1,3-4,9] | 0,004 | 2,3 [1,1-4,9] | 0,02 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 322 | 16 | 1 | | | |
| ja | 68 | 24 | 1,6 [0,9-3,2] | 0,1 | | |
| Pyrimethamin | | | | | | |
| nein | 275 | 19 | 1 | | | |
| ja | 133 | 14 | 0,7 [0,4-1,2] | 0,2 | | |
| Parität | | | | | | |
| P1 | 178 | 26 | 1 | | 1 | |
| P2 | 107 | 21 | 0,7 [0,4-1,3] | 0,3 | 0,8 [0,4-1,40] | 0,4 |
| P3 | 159 | 3 | 0,1 [0,02-0,4] | <0,001 | 0,1 [0,02-0,4] | 0,002 |
| P≥4 | 89 | 4 | 0,1 [0,05-0,4] | <0,001 | 0,1 [0,04-0,3] | <0,001 |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 167 | 16 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 218 | 15 | 0,9 [0,5-1,6] | 0,8 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 39 | 13 | 2,6 [1,2-5,7] | 0,02 | | |
| MOI (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 86 | 7 | 1 | | 1 | |
| 2 Stämme | 115 | 17 | 2,8 [1,1-7,3] | 0,03 | 3,0 [1,1-8,2] | 0,03 |
| ≥ 3 Stämme | 232 | 21 | 3,6 [1,5-8,7] | 0,003 | 3,4 [1,3-8,5] | 0,01 |
| Allelfamilie FC27 | | | | | | |
| nein | 202 | 23 | 1 | | 1 | |
| ja | 231 | 52 | 2,2 [1,3-3,9] | 0,002 | 2,2 [1,2-3,9] | 0,007 |
| FC27-10 | | | | | | |
| nein | 377 | 15 | 1 | 0,001 | | |
| ja | 56 | 29 | 2,1 [1,1-4,1] | | | |
| FC27-21 | | | | | | |
| nein | 423 | 17 | 1 | 0,055 | | |
| ja | 10 | 40 | 3,1 [0,9-11,1] | | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-10, FC27-21, die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-10, FC27-21 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-10, FC27-21 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 35: Risikofaktoren einer Frühgeburtslichkeit (Primiparae)

| | n | % Frühgeburt | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert |
|--|-----|-----------------|--------------------------------------|--------|--|--------|
| Anämie (Hb <9 g/dl) | | | | | | |
| nein | 150 | 25 | 1 | | | |
| ja | 27 | 33 | 1,4 [0,6-3,6] | 0,4 | | |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 124 | 23 | 1 | | | |
| ja | 36 | 39 | 2,0 [0,9-4,6] | 0,06 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 114 | 29 | 1 | | | |
| ja | 46 | 22 | 0,7 [0,3-1,5] | 0,4 | | |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 46 | 33 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 104 | 19 | 0,5 [0,2-1,1] | 0,07 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 23 | 43 | 1,6 [0,6-4,5] | 0,4 | | |
| MOI_ (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 32 | 6 | 1 | | 1 | |
| 2 Stämme | 47 | 30 | 6,4 [1,3-30,3] | 0,01 | 10,1 [1,2-84,3] | 0,03 |
| ≥ 3 Stämme | 99 | 31 | 6,8 [1,5-30,4] | 0,005 | 12,9 [1,6-101,8] | 0,02 |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| nein | 44 | 11 | 1 | | 1 | |
| ja | 87 | 32 | 3,7 [1,3-10,4] | 0,01 | 3,2 [1,4-7,4] | 0,005 |
| FC27-10 | | | | | | |
| nein | 151 | 25 | 1 | 0,1 | | |
| ja | 27 | 37 | 1,8 [0,8-4,3] | | | |
| FC27-21 | | | | | | |
| nein | 171 | 25 | 1 | 0,06 | | |
| ja | 4 | 57 | 4,0 [0,9-18,4] | | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-10, FC27-21, die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-10, FC27-21 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-10, FC27-21 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 36: Risikofaktoren einer Frühgeburtslichkeit (Multiparae)

| | n | % Frühgeburt | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert |
|--|-----|-----------------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| Anämie (Hb < 9 g/dl) | | | | | | |
| nein | 231 | 9 | 1 | | 1 | |
| ja | 23 | 30 | 4,4 [1,6-11,8] | 0,002 | 4,4 [1,6-11,8] | 0,002 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 189 | 11 | 1 | | | |
| ja | 32 | 6 | 0,4 [0,1-2,5] | 0,4 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 143 | 11 | 1 | | | |
| ja | 87 | 9 | 1,8 [0,8-4,3] | 0,8 | | |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 121 | 10 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 114 | 11 | 1,8 [0,8-4,3] | 0,7 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 16 | 19 | 1,8 [0,8-4,3] | 0,3 | | |
| MOI_ (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 54 | 7 | 1 | | | |
| 2 Stämme | 68 | 9 | 1,2 [0,3-4,5] | 0,2 | | |
| ≥ 3 Stämme | 133 | 14 | 1,9 [0,6-6,1] | 0,6 | | |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| nein | 126 | 8 | 1 | | | |
| ja | 129 | 14 | 1,8 [0,8-4,3] | 0,1 | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 37: Risikofaktoren einer Frühgeburtslichkeit bei Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen

| | n | % Frühgeburt | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p |
|-----------------------|-----|-----------------|-----------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| Anämie (Hb <9 g/dl) | | | | | | |
| nein | 154 | 14 | 1 | | 1 | |
| ja | 12 | 42 | 4,3 [1,3-14,8] | 0,01 | 4,3 [1,0-18,0] | 0,04 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 119 | 13 | 1 | | | |
| ja | 32 | 25 | 2,3 [0,9-6,1] | 0,08 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| nein | 100 | 16 | 1 | | | |
| ja | 51 | 14 | 0,8 [0,3-2,1] | 0,7 | | |
| Parität | | | | | | |
| P1 | 46 | 33 | 1 | | 1 | |
| P2 | 39 | 18 | 0,5 [0,2-1,3] | 0,1 | 0,5 [0,1-1,4] | 0,2 |
| P3 | 29 | 7 | 0,1 [0,03-0,7] | 0,01 | 0,1 [0,02-0,7] | 0,02 |
| P≥4 | 53 | 6 | 0,1 [0,03-0,4] | 0,001 | 0,1 [0,03-0,5] | 0,003 |
| MOI (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 44 | 5 | 1 | | 1 | |
| 2 Stämme | 62 | 16 | 4,0 [0,8-19,4] | 0,06 | 3,7 [0,7-18,6] | 0,1 |
| ≥ 3 Stämme | 61 | 25 | 6,8 [1,5-31,7] | 0,006 | 5,8 [1,2-28,3] | 0,02 |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| nein | 47 | 6 | 1 | | 1 | |
| ja | 58 | 24 | 4,7 [1,3-17,4] | 0,01 | 2,9 [1,2-7,4] | 0,03 |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 38: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichts (gesamten Studiengruppe)

| | n | % LBW | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert |
|--|-----|----------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| Frühgeburtlichkeit | | | | | | |
| Nein | 355 | 12 | 1 | | 1 | |
| Ja | 75 | 59 | 10,3 [5,9-18,0] | <0,001 | 9,1[4,6-17,8] | <0,001 |
| Anämie (Hb <9 g/dl) | | | | | | |
| Nein | 398 | 19 | 1 | | 1 | |
| Ja | 55 | 16 | 3,6 [2,0-6,6] | <0,001 | 2,3 [1,1-5,2] | 0,03 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 337 | 21 | 1 | | | |
| Ja | 73 | 32 | 1,7 [1,1-3,1] | 0,04 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 270 | 26 | 1 | | | |
| Ja | 140 | 16 | 0,6 [0,3-0,9] | 0,04 | | |
| Parität | | | | | | |
| P1 | 186 | 33 | 1 | | 1 | |
| P2 | 115 | 16 | 0,3 [0,2-0,7] | 0,001 | 0,3 [0,1-0,7] | 0,04 |
| P3 | 59 | 12 | 0,3 [0,1-0,6] | 0,001 | 0,3 [0,1-1,0] | 0,05 |
| P≥4 | 96 | 14 | 0,3 [0,3-0,6] | 0,001 | 0,4 [0,2-0,9] | 0,04 |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 133 | 20 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 171 | 26 | 1,4 [0,8-2,5] | 0,5 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 30 | 37 | 2,4 [1,0-5,6] | 0,05 | | |
| MOI_ (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 87 | 12 | 1 | | | |
| 2 Stämme | 125 | 22 | 2,1 [0,8-2,5] | 0,06 | | |
| ≥ 3 Stämme | 244 | 26 | 2,4 [1,0-5,6] | 0,006 | | |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| Nein | 214 | 17 | 1 | | | |
| Ja | 242 | 26 | 1,7 [1,1-2,7] | 0,03 | | |
| FC27-08 | | | | | | |
| Nein | 427 | 21 | 1 | | | |
| Ja | 29 | 38 | 2,3 [1,1-5,1] | 0,03 | | |
| FC27-12 | | | | | | |
| Nein | 429 | 21 | 1 | | | |
| Ja | 27 | 40 | 3,1 [1,4-6,8] | 0,03 | | |
| FC27-19 | | | | | | |
| Nein | 436 | 21 | 1 | | | |
| Ja | 20 | 45 | 1,2 [1,2-7,7] | 0,01 | | |
| FC27-21 | | | | | | |
| Nein | 443 | 21 | 1 | | | |
| Ja | 13 | 46 | 3,1 [1,0-9,7] | 0,03 | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21, die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 39: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichtes (Primiparae)

| | n | % LBW | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p- Wert | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p-Wert |
|--|-----|----------|-----------------------------------|---------|-------------------------------------|--------|
| Frühgeburlichkeit | | | | | | |
| Nein | 130 | 18 | 1 | | 1 | |
| Ja | 47 | 70 | 10,4 [4,8-22,4] | <0,001 | 10,0 [4,2-23,7] | <0,001 |
| Anämie (Hb <9 g/dl) | | | | | | |
| Nein | 155 | 29 | 1 | | 1 | |
| Ja | 29 | 55 | 3,0 [1,3-6,7] | 0,006 | 2,7 [1,0-7,6] | 0,04 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 129 | 31 | 1 | | | |
| Ja | 38 | 47 | 2,0 [0,9-4,2] | 0,06 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 117 | 38 | 1 | | | |
| Ja | 50 | 28 | 0,6 [0,3-1,3] | 0,2 | | |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 46 | 37 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 110 | 32 | 0,7 [0,4-1,6] | 0,5 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 24 | 42 | 1,1 [0,4-3,3] | 0,7 | | |
| MOI_ (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 32 | 16 | 1 | | | |
| 2 Stämme | 50 | 32 | 2,5 [0,8-7,8] | 0,09 | | |
| ≥ 3 Stämme | 104 | 62 | 3,5 [1,3-9,9] | 0,01 | | |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| Nein | 80 | 24 | 1 | | 1 | |
| Ja | 106 | 41 | 2,2 [1,2-4,2] | 0,02 | 1,9 [0,95-3,9] | 0,06 |
| FC27-08 | | | | | | |
| Nein | 172 | 32 | 1 | | | |
| Ja | 14 | 50 | 2,1 [0,7-6,4] | 0,2 | | |
| FC27-12 | | | | | | |
| Nein | 178 | 32 | 1 | | | |
| Ja | 8 | 75 | 2,1 [0,8-6,0] | 0,1 | | |
| FC27-19 | | | | | | |
| Nein | 178 | 33 | 1 | | | |
| Ja | 8 | 38 | 6,5 [1,3-33,4] | 0,01 | | |
| FC27-21 | | | | | | |
| Nein | 178 | 33 | 1 | | | |
| Ja | 8 | 38 | 1,2 [0,3-5,2] | 0,8 | | |

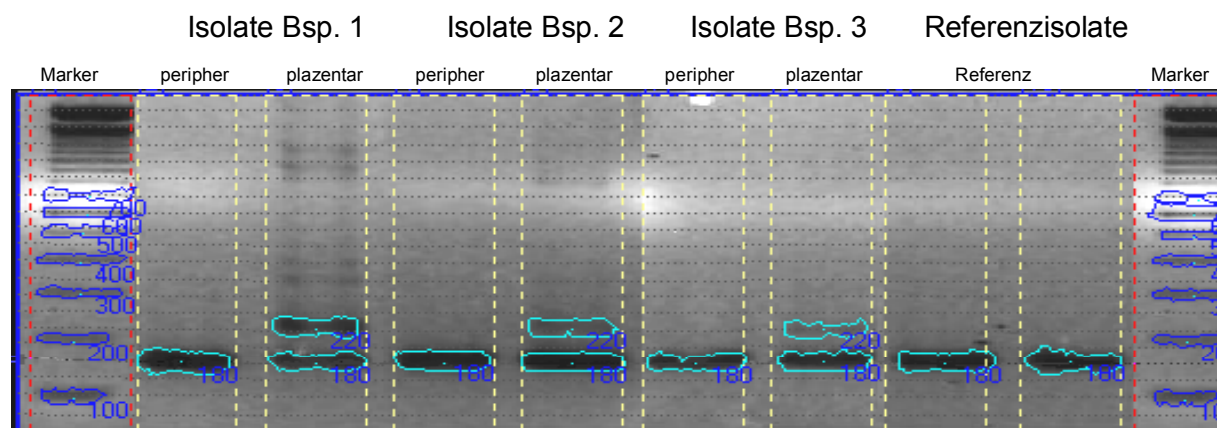
Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21, die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

Tabelle 40: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichtes (Multiparae)

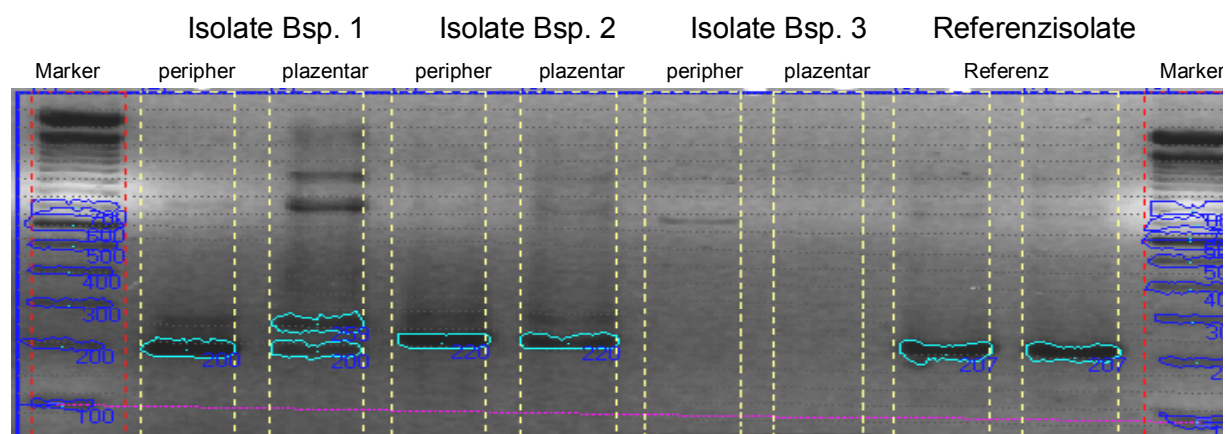
| | n | % LBW | Univariate Odds Ratio [95% KI] | p | Multivariate Odds Ratio [95% KI] | p |
|--|-----|----------|-----------------------------------|--------|-------------------------------------|------------|
| Frühgeburtlichkeit | | | | | | |
| Nein | 19 | 8 | 1 | | 1 | |
| Ja | 11 | 39 | 7,0 [2,9-17,1] | <0,001 | 5,9 [2,4-4,9] | >0,00 1 |
| Anämie (Hb <9 g/dl) | | | | | | |
| Nein | 243 | 12 | 1 | | 1 | |
| Ja | 26 | 35 | 3,9 [1,6-9,6] | 0,002 | 2,7 [0,9-8,0] | 0,07 |
| Chloroquin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 208 | 14 | 1 | | | |
| Ja | 35 | 14 | 1,0 [0,4-2,9] | 0,9 | | |
| Pyrimethamin-Nachweis | | | | | | |
| Nein | 153 | 16 | 1 | | | |
| Ja | 90 | 10 | 0,6 [0,3-1,3] | 0,2 | | |
| Parasitendichte Plazenta | | | | | | |
| submic. | 129 | 13 | 1 | | | |
| 1-10 ³ P/10 ² BF | 120 | 13 | 1,0 [0,5-2,1] | 0,9 | | |
| >10 ³ P/10 ² BF | 18 | 22 | 1,4 [0,4-5,4] | 0,9 | | |
| MOI_ (plaz. Isolat) | | | | | | |
| 1 Stamm | 55 | 5 | 1 | | | |
| 2 Stämme | 75 | 15 | 1,7 [0,6-5,3] | 0,2 | | |
| ≥ 3 Stämme | 140 | 16 | 1,8 [0,7-5,2] | 0,3 | | |
| Stämme FC27 | | | | | | |
| Nein | 134 | 13 | 1 | | | |
| Ja | 136 | 15 | 1,1 [0,6-2,2] | 0,7 | | |

Aus dem logistischen Regressionsmodell wurde zur Untersuchung des Einflusses der Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 die Allelfamilie FC27 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Zur Untersuchung des Einflusses der Allelfamilie FC27 wurden die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 und die Multiplizität der Infektion (MOI [plaz. Isolat]) aus dem logistischen Regressionsmodell entfernt. Danach wurde zur Untersuchung des Einflusses der Multiplizität der Infektion die Allelfamilie FC27 sowie die Genotypen FC27-08, FC27-12, FC27-19, FC27-21 aus dem Regressionsmodell entfernt. Diese Größen waren direkt voneinander abhängig und sollten deshalb getrennt voneinander untersucht werden. Alle anderen Faktoren wurden bei jeder Analyse im logistischen Regressionsmodell belassen; 95% KI: 95%-Konfidenzintervall.

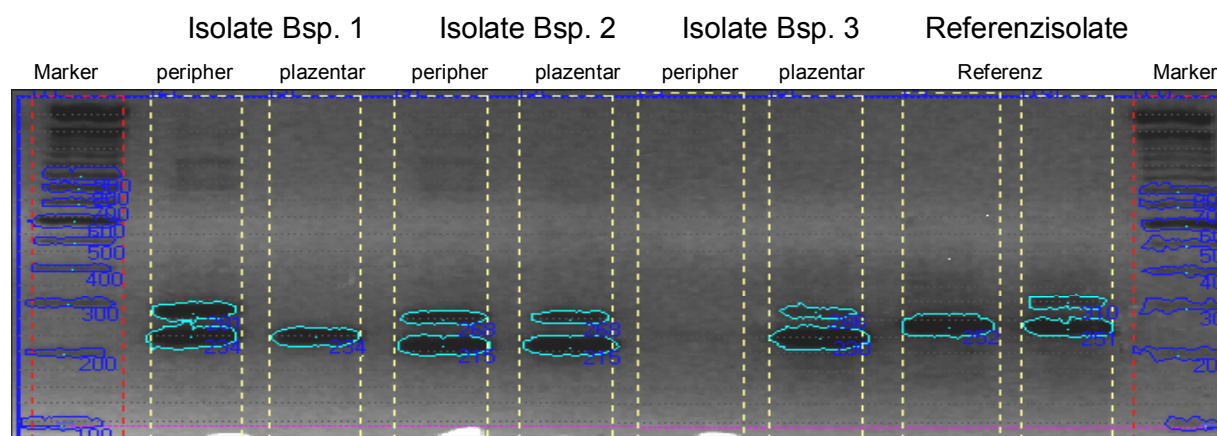
Ro33



- Mad20

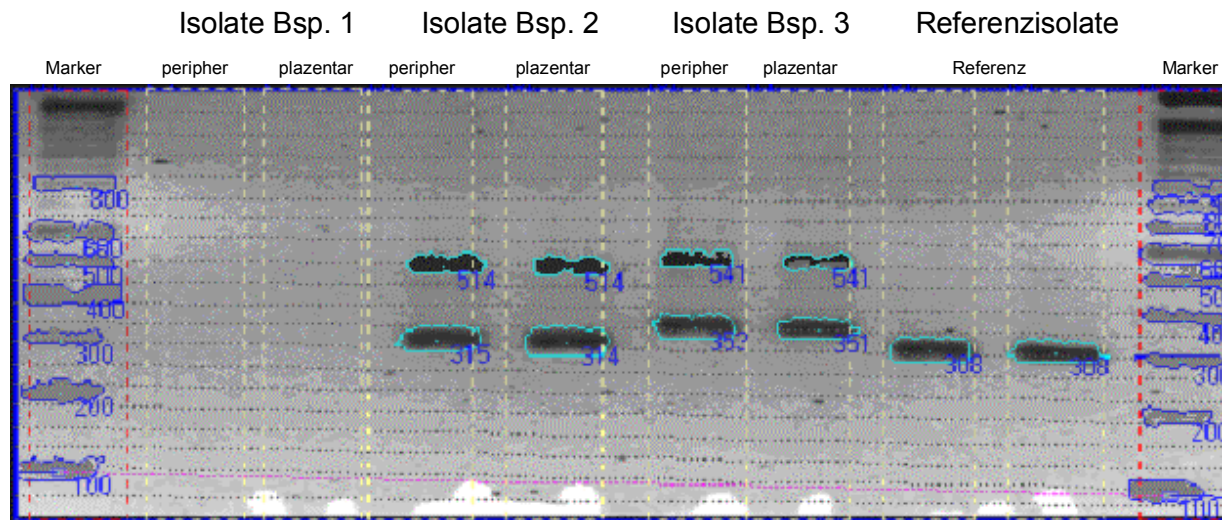


- K1

Abbildung 13: Gelanalyse der PCR-Amplifikationsreaktionen des *msp-1*

Beispiele von mit BioDocAnalyse ausgewerteten Elektrophoresegelel der PCR-Produkte von zusammengehörenden plazentar und peripher gewonnenen Isolatn der Allelfamilien des *msp-1*, Referenzisolate positiver *P. falciparum*-Proben zum Nachweis einer erfolgreichen Amplifikationsreaktion.

- FC27



- IC

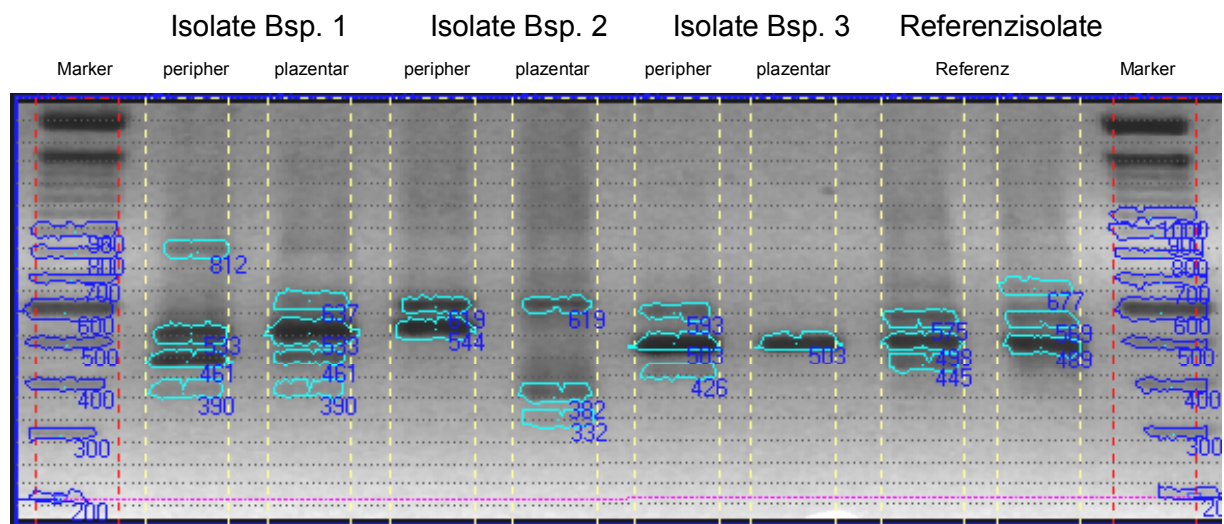


Abbildung 14: Gelanalyse der PCR-Amplifikationsreaktionen des *msp-2*

Beispiele von mit BioDocAnalyse ausgewerteten Elektrophoresegele der PCR-Produkte von zusammengehörenden plazentar und peripher gewonnenen Isolatzen der Allelfamilien des *msp-2*, Referenzisolate positiver *P.-falciparum*-Proben zum Nachweis einer erfolgreichen Amplifikationsreaktion.

4 Diskussion

In Endemiegebieten stellt die Malaria tropica in der Schwangerschaft noch immer ein erhebliches Gesundheitsproblem dar (McGregor 1984; Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000). Nur wenig ist über die Häufigkeit und Bedeutung polyklonaler Infektionen mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft bekannt. Die wenigen hierzu veröffentlichten Arbeiten sind zudem widersprüchlich (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Kassberger *et al.* 2002; Saute *et al.* 2002). Verschiedene Studien in Endemiegebieten bei Kindern und Erwachsenen über die klonale Zusammensetzung von Infektionen mit *P. falciparum* haben gezeigt, dass es möglicherweise Zusammenhänge zwischen der Multiplizität der Infektion und klinischer Manifestation der Malaria gibt (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Andere Studien zeigten, dass polyklonale *P.-falciparum*-Infektionen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Abwehrmechanismen und einer körpereigenen Immunität haben (Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass bestimmte Genotypen von *P. falciparum* mit klinischen Manifestationsformen einer Malaria assoziiert sind (Engelbrecht *et al.* 1995; Gupta *et al.* 1995; Robert *et al.* 1996; Arie *et al.* 2001; Ofosu-Okyere *et al.* 2001). Die meisten Studien, die diese Themen beleuchteten, führten Analysen auf der Grundlage peripher gewonnener Blutproben durch (Engelbrecht *et al.* 1995; Gupta *et al.* 1995; Robert *et al.* 1996; Felger *et al.* 1999; Arie *et al.* 2001; Beck *et al.* 2001; Ofosu-Okyere *et al.* 2001). Es ist jedoch ungeklärt, ob diese die Gesamtheit aller koinfizierenden Genotypen bei Schwangeren darstellen kann (Kamwendo *et al.* 2002; Kassberger *et al.* 2002; Schleiermacher *et al.* 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zusammenhänge darzustellen, die mit der Infektion von spezifischen Genotypen und der Multiplizität der Infektion bei Schwangeren assoziiert sind. Um die Gesamtheit aller Genotypen darstellen zu können, wurden Analysen aus peripher und plazentar gewonnenen Isolaten durchgeführt. Die wichtigsten in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Spezifische Genotypen konnten signifikant häufiger in Agogo, andere spezifische Genotypen konnten signifikant häufiger in der ländlichen Umgebung beobachtet werden.
2. Eine Assoziation spezifischer Genotypen mit der Parität konnte nicht nachgewiesen werden.
3. Die Genotypisierung aus peripher gewonnen *P.-falciparum*-Isolaten spiegelte nur in 12% der Fälle das klonale Gesamtbild einer *P.-falciparum*-Infektion bei schwangeren Frauen wider.

4. Spezifische Genotypen von *P. falciparum* konnten signifikant häufiger ausschließlich in plazentar gewonnenen Isolaten nachgewiesen werden, als ausschließlich in peripher gewonnenen.
5. Die Allelfamilie FC27 war in multivariater Analyse mit Frühgeburtlichkeit assoziiert. Zumindest zeigte sich in univariater Analyse eine Assoziation mit vermindertem Geburtsgewicht und Anämie.
6. Der Anteil an polyklonalen plazentaren *P.-falciparum*-Infektion war mit 81% sehr hoch. Die Multiplizität der Infektion korrelierte vor allem mit der Parasitendichte der Infektion. Eine Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion von Alter und Parität konnte nur in Abhängigkeit zur Parasitendichte nachgewiesen werden.
7. Im Vergleich zu monoklonalen plazentaren Infektionen war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Frühgeburt bei Infektionen mit zwei oder mehr als zwei Stämmen unabhängig von der Parasitendichte erhöht. Dies konnte insbesondere bei Primiparae und zudem bei Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen beobachtet werden.

Die folgende Diskussion der Arbeit setzt sich zuerst kritisch mit verwendeten Methoden auseinander, anschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Studiendesign

Die Befund der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Querschnittstudie erhoben. Dieses Studiendesign macht es in erster Linie möglich, Aussagen zur Prävalenz einzelner Genotypen von *P. falciparum* und von polyklonalen *P.-falciparum*-Infektionen zu treffen. Die Exploration war somit das Hauptinteresse dieser Studie. Prinzipiell kann bei Querschnittstudien innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums eine große Zahl an Probanden untersucht werden. Innerhalb eines Jahres konnten so am Presbyterian Mission Hospital Agogo insgesamt 893 gebärende Frauen untersucht werden. Gegenstand der hier beschriebenen Analysen waren die Frauen, die eine plazentare Malaria aufwiesen. Eine derartige Probandinnenzahl ermöglicht einen hohen Grad an Repräsentativität. Die Infektion mit *P. falciparum* stellt jedoch in Endemiegebieten häufig eine chronische Infektion dar (Bulmer *et al.* 1993; Fried *et al.* 1996). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass neben den hier untersuchten Faktoren der Verlauf sowie die Dynamik einer Infektion eine wichtige Bedeutung für ihre klinische Manifestation haben. Da für die hier bearbeiteten Fragestellungen plazentare Untersuchungsproben notwendig waren, konnte das Untersuchungsmaterial erst nach der Geburt des Kindes gewonnen werden. Eine schwangerschaftsbegleitende Langzeitstudie war

somit nicht möglich, wäre aber aussagekräftiger als eine Querschnittsstudie. Jedoch konnten durch mikroskopische Untersuchungen des plazentaren Blutausrichs Rückschlüsse auf die Infektionsdauer gezogen werden (Bulmer *et al.* 1993). Die Rekrutierungszeit von einem Jahr hatte zudem den Vorteil, dass ein Teil der Probandinnen während der Regenzeit und ein anderer während der Trockenzeit ihre Kinder gebaren. Saisonale Einflüsse konnten so ebenfalls berücksichtigt werden. Die 474 untersuchten Frauen kamen aus der Stadt Agogo (n = 243) und aus der umliegenden ländlichen Gegend (n = 231). Die Ergebnisse von Frauen aus Agogo und der ländlichen Umgebung im Bezug auf die Multiplizität der Infektion waren annähernd gleich. Infolgedessen wurde bei der Untersuchung der Multiplizität der Infektion auf eine Unterteilung der statistischen Analysen in Land- und Stadtbevölkerung verzichtet. Die Diversität wurde getrennt nach dem Wohnort der Patientinnen untersucht. Hierdurch konnten lokale Unterschiede erkannt werden.

Nachweis einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion

Zum Nachweis einer plazentaren Infektion mit *P. falciparum* erfolgten mikroskopische Untersuchungen. Die Nachweisgrenze der Parasitämie liegt bei einer Parasitendichte von ca. 0,0003% (Clendennen *et al.* 1995). Zur Sicherung der mikroskopischen Diagnose erfolgte zusätzlich der Nachweis parasitärer DNA mittels diagnostischer PCR. Bei allen Frauen, bei denen keine plazentare Infektion mikroskopisch nachweisbar war, erfolgte ebenfalls eine diagnostische PCR. Hierdurch erhöht sich die Probandenzahl. Die geschätzte Parasitendichte bei Infektionen, die nur mittels diagnostischer PCR, nicht aber mit der Mikroskopie nachgewiesen werden können, entspricht nach Einschätzungen verschiedener Arbeitsgruppen ca. 0,00005% (Snounou *et al.* 1993; May *et al.* 1999).

Genotypisierung von *P. falciparum*

Um die Diversität von *P. falciparum* und die Multiplizität der Infektion bestimmen zu können, wurden in der hier dargestellten Arbeit *msp-1* und *msp-2* typisiert. Zur Typisierung dieser hoch polymorphen Gene wurde die von Snounou *et al.* (1999) etablierte Methode einer kombinierten, geschachtelten PCR verwendet. Diese Methode ist spezifisch für *P. falciparum*, so dass nur bei positiven *P.-falciparum*-Proben eine Genotypisierung erfolgte. Infektionen mit *P. ovale*, *P. malariae* oder *P. vivax* führen zu keinem positiven PCR-Ergebnis (Snounou *et al.* 1999). Zudem ist die Sensitivität der Methode sehr hoch. Snounou *et al.* (1999) beschreiben, dass auch nach 10-facher Serienverdünnung des ursprünglichen Reaktionsansatzes mit genomischer DNA von nur 10 Parasiten durchgehend ein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Snounou *et al.* (1999) versichern, dass das Ergebnis der PCR nicht durch die ursprüngliche DNA-Menge beeinflusst wurde, so dass die Reaktion nach dem „Alles-oder-Nichts“ Gesetz folgte. Dies hatte den großen Vorteil, dass diese Methode auch bei den submikroskopischen Infektionen, wie sie

häufig im Untersuchungsgebiet von Agogo auftreten (Mockenhaupt *et al.* 2000; Beck *et al.* 2001), nicht zu falschnegativen Ergebnissen führte. Trotz der hohen Sensitivität der von Snounou etablierten PCR-Methode zur Genotypisierung soll aber betont werden, dass bei anderen PCR-Methoden, die von anderen Arbeitsgruppen verwendet wurden, eine Abhängigkeit der Sensitivität von der Parasitendichte beschrieben wurde. Bei sehr niedrigen Konzentrationen an genetischem Material konnte nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Allele nicht erkannt wurden (Contamin *et al.* 1995; Schleiermacher *et al.* 2001). Es könnte also sein, dass auch in der hier beschriebenen Arbeit einzelne Genotypen nicht erkannt wurden und so die Diversität von *P. falciparum* sowie die Multiplizität der Infektion als zu niedrig eingeschätzt wurden. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde bei einem unklaren Ergebnis die PCR wiederholt. Die PCR-Reaktionen lieferten in 474 Fällen ein positives Ergebnis. Das heißt, dass wenigstens ein Allel in jedem Fall nachgewiesen wurde. Zur Steigerung der Sensitivität einer PCR könnte bei zukünftigen Untersuchungen in Betracht gezogen werden, das PCR-Produkt radioaktiv zu markieren. Eine solche Markierung würde, wie Bottius *et al.* (1996) beschreiben, die Sensitivität um das 10-fache erhöhen.

In der ersten äußeren Amplifikationsreaktion wurden Primer gewählt, die so strukturiert sind, dass sie alle bis heute für *P. falciparum* bekannten Sequenzvarianten hybridisieren. Snounou *et al.* (1999) wiesen nach, dass eine kombinierte äußere Amplifikationsreaktion mit Primerpaaren spezifisch für *msp-1* und *msp-2* die Spezifität und Sensitivität der inneren PCR nicht beeinflussen. In vorliegender Arbeit wurden ebenfalls die Primerpaare für beide Genloci kombiniert. Hieraus entstand ein großer zeitlicher Vorteil. Zum Nachweis der verschiedenen Gensequenzen der einzelnen Allelfamilien von *msp-1* und *msp-2* wurde nach der gemeinsamen äußeren PCR mit fünf verschiedenen getrennten inneren PCR-Ansätzen die 3 Allelfamilien von *msp-1* (K1, Mad20, Ro33) und die 2 Allelfamilien von *msp-2* (FC27, IC) bestimmt.

Nach Amplifikation der für die einzelnen Allelfamilien spezifischen Gensequenzen wurden die einzelnen Allele der jeweiligen Allelfamilie, die sich durch die Unterschiede der Basenpaarlänge auszeichnen, entsprechend ihrer Basenpaarlänge mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt. Da die Unterschiede der Basenpaarlänge eines jeden Allels sehr gering sein können, war eine hohe Trennschärfe nötig. Um diese zu erreichen, wurde die kostenintensive GTG-Agarose und eine sehr lange Elektrophoresezeit von 2 Stunden gewählt. Um das höchste Maß an Trennschärfe zu erreichen, wurde auf die von Snounou *et al.* (1999) vorgeschlagene wiederholte Verwendung der GTG-Agarose bewusst verzichtet. Um die Basenpaarlänge eines jeden Amplifikates, die spezifisch für jedes einzelne Allel ist, so genau wie möglich zu ermitteln, wurde sie mit dem digitalen Auswertungsprogramm BioDocAnalyse analysiert (Nuske 1999). Mit BioDocAnalyse können „ungleichmäßig gelaufene Gele“, welche ein störendes Phänomen bei einer derartig langen Elektrophoresezeit darstellen, so entzerrt werden, dass eine Auswertung möglich bleibt (Nuske 1999). Jedoch hat auch ein digitales Auswertungsprogramm Grenzen.

Einzelne wenige Allele, die sich in vorliegender Arbeit nur um einzelne Basenpaare unterschieden, konnten möglicherweise nicht als zu unterscheidende Allele erkannt werden und galten fälschlicherweise als identisch. Es wäre also möglich, dass auch hier die Diversität von *P. falciparum* als zu niedrig eingeschätzt wurde. Ein weiterer Grund zu Fehleinschätzungen sind die methodischen Grenzen der Gel-Elektrophorese. Wie auch von anderen Arbeitsgruppen wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Einteilung der Allele eine Varianzbreite von zwanzig Basenpaaren zugelassen (Konate *et al.* 1999; Snounou *et al.* 1999). Auch hier besteht die Möglichkeit, dass einzelne Allele nicht voneinander unterschieden werden konnten. Die Diversität von *P. falciparum* kann auch durch diese methodischen Grenzen unterschätzt werden.

Die Allele der einzelnen Allelfamilien unterscheiden sich, wie beschrieben, zum einen in ihrer Basenpaarlänge und zum anderen in ihrer Allelsequenz. Die Hauptunterschiede der Allelsequenzen, wie die der einzelnen Allelfamilien, werden problemlos durch die verschiedenen spezifischen Primer in der PCR erkannt. Kleine Sequenzvarianten der DNA einzelner Allelabschnitte, wie sie nach Punktmutationen auftreten können (Contamin *et al.* 1995; Snounou *et al.* 1999), sind mit dieser Methode nicht in jedem Fall erkennbar. Zwei Allele, die zufällig eine gleiche Basenpaarlänge besitzen, könnten also kleine Unterschiede in der Sequenz bzw. der Sequenzabfolge aufweisen und würden mit dieser Methode nicht als zu unterscheidende Allele erkannt (Snounou *et al.* 1998).

Durch ein direktes Sequenzieren eines jeden DNA-Amplifikats könnten theoretisch die zuvor beschriebenen Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Es wäre möglich, die genaue Nukleotidabfolge für ein jedes Allel zu erkennen. Verschiedene Genotypen könnten so mit absoluter Sicherheit voneinander unterschieden werden. Jedoch wird das Sequenzieren für epidemiologische Untersuchungen als nicht sehr praktikabel beschrieben, da es aufwendig und kostenintensiv ist (Snounou *et al.* 1998). Man könnte aber in Erwägung ziehen, eine Genotypisierung auf parasitärer RNA-Ebene durchzuführen. Eine derartige Methode konnte sich aber bis heute nicht für die Genotypisierung von *msp-1* und *msp-2* unter Feldbedingungen durchsetzen, was durch die Instabilität der RNA gegen RNA-zerstörende Enzyme bedingt ist.

Erst kürzlich wurden in einer Multicenterstudie unterschiedliche PCR-Methoden, die von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Genotypisierung von *msp-1* und *msp-2* genutzt werden, auf Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse untersucht (Färnert *et al.* 2001). Die Sensitivität und die Spezifität der verschiedenen PCR-Methoden waren, mit wenigen Ausnahmen, ähnlich hoch. Internationale Arbeitsgruppen haben abschließend festgestellt, dass trotz der zuvor beschriebenen Grenzen die PCR derzeit die am besten geeignete Methode zur Typisierung polymorpher Gene darstellt. Daraus ergibt sich, dass sie als das wichtigste Werkzeug zur Darstellung der Diversität von *P. falciparum* und zur Darstellung der Multiplizität der Infektion in epidemiologischen Studien angesehen wird (Färnert *et al.* 2001). *Msp-1* und *msp-2* gelten

derzeit als die aussagekräftigsten Marker. Die Kombination verschiedener Genloci, wie in der vorliegenden Arbeit die Kombination von *msp-1* und *msp-2*, erhöht deren Aussagekraft zur Bestimmung der Multiplizität der Infektion (Ntoumi *et al.* 1995; Beck *et al.* 1997; Babiker *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 *P.-falciparum*-Infektionen in der Schwangerschaft

Die Infektion mit *P. falciparum* ist ein häufiger Befund bei schwangeren Frauen in hochendemischen Malariagebieten (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Menendez *et al.* 2000; Shulman *et al.* 2001). Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Prävalenz einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion im Endemiegebiet von Agogo hoch ist. So wurde bei 53% aller untersuchten Gebärenden eine plazentare Infektion mit *P. falciparum* nachgewiesen. Die Prävalenz einer *P.-falciparum*-Infektion liegt bei Nichtschwangeren der Ashanti Region mit 49% etwas unter der hier ermittelten, wobei die Durchseuchung im Untersuchungsgebiet im Vergleich zu anderen Gebieten Ghanas als hoch einzuschätzen ist (Browne *et al.* 2000). Ähnlich wie in anderen Untersuchungen (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000; Mockenhaupt *et al.* 2002) waren in der hier dargestellten Studie die Prävalenz einer mikroskopisch nachweisbaren *P.-falciparum*-Infektion in der Plazenta sowie die plazentaren Parasitendichten bei Primiparae signifikant höher als bei Multiparae.

Eine plazentare Malaria geht mit schweren Gesundheitskomplikationen für die Mutter und in Folge für das Neugeborene einher. So wiesen neben anderen Sullivan *et al.* (1999) und Menendez *et al.* (2000) ein signifikant höheres Risiko für eine Frühgeburtlichkeit und ein vermindertes Geburtsgewicht bei einer plazentaren Malaria nach. Die Prävalenz einer Frühgeburtlichkeit (18%) und eines verminderten Geburtsgewichtes (22%) war bei den hier untersuchten Gebärenden genau wie in anderen Malaria-Endemiegebieten sehr hoch (Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000). Primiparae waren im Vergleich zu Multiparae signifikant häufiger von einer Frühgeburtlichkeit sowie einem verminderten Geburtsgewicht betroffen (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Ordi *et al.* 1998; Sullivan *et al.* 1999; Shulman *et al.* 2001). Zur Prävention derartiger Komplikationen sollte unter anderem die frühe Diagnosestellung einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion bei Schwangeren von besonderem klinischen Interesse sein. Ein hoher Anteil an plazentaren Infektionen wird jedoch durch die mikroskopische Untersuchung peripher gewonnener Blutproben nicht nachgewiesen (Leke *et al.* 1999; Mockenhaupt *et al.* 2002). So verglichen Mockenhaupt *et al.* (2002) verschiedene Methoden zur peripheren Diagnostik einer plazentaren *P.-falciparum*-Infektion. Sie stellten fest, dass im Gegensatz zur mikroskopischen Untersuchung und dem Nachweis von *P. falciparum* sekretiertem Histidin-Rich-Protein 2 (HRP2) die diagnostische PCR aus einer peripheren

Blutprobe zu fast 100% eine plazentare Malaria darstellen kann. Zur Wertung dieses Befundes wurde von Mockenhaupt *et al.* (2002) wie auch von Snounou *et al.* (1993) angenommen, dass es bei einer plazentaren Malaria zu einer sehr niedrigen, oft sogar nur submikroskopischen peripheren Parasitämie kommt. Andererseits diskutierten Mockenhaupt *et al.* (2002), dass der Nachweis nicht vitaler genomischer DNA von Parasiten, die zuvor in der Plazenta phagozytiert wurde, Ursache für ein positives PCR-Ergebnis sein könnte (Snounou *et al.* 1993; Mockenhaupt *et al.* 2002). Die diagnostische PCR aus einer peripheren Blutprobe bei einer Schwangeren konnte somit lediglich eine Information darüber geben, ob die Schwangere mit *P. falciparum* infiziert ist. Eine Aussage über eine plazentare Sequestration einzelner Subtypen von *P. falciparum* konnte mit dieser Methode nicht getroffen werden. Außerdem konnte keine Informationen darüber gewonnen werden, mit wie viel verschiedenen Genotypen die Schwangere infiziert war. Da jedoch in Endemiegebieten Infektionen mit *P. falciparum* sehr häufig polyklonal verlaufen (Robert *et al.* 1996; Beck *et al.* 1997; Smith *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001), könnte angenommen werden, dass bei einer Genotypisierung der Parasiten aus einer peripheren Blutprobe nur ein Teil der Parasitenpopulation erkannt wurde. Dies ist insofern problematisch, als es in verschiedenen Studien, die Untersuchungen zur Epidemiologie polyklonaler *P.-falciparum*-Infektionen bei Schwangeren durchgeführt haben, möglicherweise zu Fehlinterpretationen gekommen ist (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001; Saute *et al.* 2002). Beispielsweise wiesen Beck *et al.* (2001) im Untersuchungsgebiet der vorliegenden Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Multiplizität der Infektion und einer Anämie, dem Alter und der Gravidität nach, was hier nur eingeschränkt bestätigt werden konnte.

4.2.2 Diversität von *P. falciparum*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *P. falciparum* im holoendemischen Untersuchungsgebiet von Agogo und Umgebung eine sehr hohe genetische Diversität besitzt. Durch die Genotypisierung von *msp-1* und *msp-2* konnten insgesamt 22 Allele des *msp-1* und 40 Allele des *msp-2* bestimmt werden. Eine derartig hohe Diversität von *P. falciparum* konnten Beck *et al.* (2001) im gleichen Untersuchungsgebiet nicht nachweisen. Bei der damaligen Untersuchung wurden lediglich 12 voneinander zu unterscheidende Allele des *msp-1* ermittelt. Dieser Unterschied beim Nachweis der Diversität von Beck *et al.* (2001) und der vorliegenden Arbeit ist höchstwahrscheinlich auf die weniger sensible PCR-Methode zurückzuführen, die in den Untersuchungen von Beck *et al.* (2001) verwendet wurde. Zudem erfolgten die Auswertungen der PCR-Amplifikatbanden der Gelelektrophorese nicht rechnergestützt. Da jedoch einzelne Allele nur sehr geringe Unterschiede aufweisen können (Snounou *et al.* 1998), kann eine manuelle Auswertung dazu führen, dass einzelne Allele nicht voneinander unterschieden werden können. Durch die Verwendung einer hochsensitiven geschachtelten

PCR-Methode und der digitalen Auswertung mit dem Auswertungsprogramm BioDocAnalyse konnte bei der vorliegenden Arbeit die für holoendemische Malariagebiete übliche Diversität von *P. falciparum* ermittelt werden. In Bezug auf die genetische Diversität von *P. falciparum* entspricht so das Ergebnis der vorliegenden Arbeit anderen Studien in Endemiegebieten Afrikas (Contamin *et al.* 1995; Robert *et al.* 1996; Beck *et al.* 1997; Färnert *et al.* 1999; Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001), dagegen erscheint die von Beck *et al.* (2001) ermittelte Diversität von *P. falciparum* für ein holoendemisches Malariagebiet als zu niedrig.

Wie von verschiedenen Autoren beschrieben, ist die Diversität von *P. falciparum* von der Transmission des Erregers abhängig (Contamin *et al.* 1995; Robert *et al.* 1996; Beck *et al.* 1997; Färnert *et al.* 1999; Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001). So wurde in anderen holo- und mesoendemischen Gebieten eine hohe genetische Diversität von *P. falciparum* beobachtet (Robert *et al.* 1996; Felger *et al.* 1999). Beispielsweise konnten in einer Studie in einem mesoendemischen Gebiet in Senegal 33 *msp-1*-Allele und 47 *msp-2*-Allele nachgewiesen werden (Konate *et al.* 1999). In West Uganda bestimmten Peyerl-Hoffmann *et al.* (2001) 22 verschiedene *msp-1* und 24 *msp-2* Allele. Dagegen ist die Diversität von *P. falciparum* in Gebieten mit geringer Erregerübertragung auch eher niedrig. So wurde im Sudan (*msp-1* 13 Allele) oder in Honduras (*msp-1* 5 Allele) eine niedrige Diversität des Erreger beschrieben (Babiker *et al.* 1997; Haddad *et al.* 1999).

Als Ursache für die größere genetische Diversität von *P. falciparum* in Gebieten hoher Erregertransmission wird die erhöhte Rekombinationsrate parasitärer Gene während der Fertilisation männlicher und weiblicher Gameten in der Anophelesmücke verantwortlich gemacht (Babiker *et al.* 1999). Dagegen kommt es bei der klonalen Teilung des Parasiten im Menschen nicht zu entscheidenden genetischen Veränderungen (Babiker *et al.* 1999).

Verschiedene Genotypen in Agogo und Umgebung

Bemerkenswert erscheint, dass bei der vorliegenden Untersuchung einzelne Genotypen, nämlich IC-12, FC27-16 und K1-09 signifikant häufiger in Agogo und Mad20-06 signifikant häufiger in der ländlichen Umgebung auftreten (Tab 13). Dass die Verbreitung verschiedener Allele geographisch unterschiedlich ist, konnte in verschiedenen Endemiegebieten nachgewiesen werden (Creasey *et al.* 1990; Babiker *et al.* 1997). Ein Unterschied in der Allelverbreitung unmittelbar benachbarter Gebiete mit ähnlicher Erregertransmission erscheint dabei erstaunlich, da die geografische Nähe eine gleiche Allelverteilung erwarten lässt. Ob dieser Befund einen Zufallsbefund darstellt oder bedingt ist durch verschiedene lokale Einflüsse, wie z. B. den Zugang zu antiparasitären Medikamenten und die Bereitschaft zur Einnahme einer Malariaphylaxe, bedarf sicher weiterer Untersuchungen. Interessanterweise konnten derartige Unterschiede der Genotypenverbreitung auch bei zwei benachbarten Dörfern

in Senegal (Dielmo und Ndiop) beobachtet werden (Konate *et al.* 1999). Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung weisen jedoch diese Dörfer trotz der geographischen Nähe Unterschiede in der Erregertransmission auf. So wird in Dielmo die Malaria ganzjährig beobachtet, in Ndiop dagegen tritt sie epidemisch während der Regenzeit auf. Der Austausch zwischen beiden Dörfern wird als sehr begrenzt beschrieben (Konate *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu gibt es einen regen Austausch zwischen Agogo und Umgebung.

Auch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die Allelverbreitung geographisch unterschiedlich ist. Es wird deutlich, dass sich die Erregerpopulation selbst bei benachbarten Orten mit gleicher Erregertransmission unterscheiden können. Da MSP-Antigene als potentielle Zielstrukturen für immunotherapeutische Moleküle gelten (Chappel *et al.* 1993; Keitel *et al.* 1999), ist es wichtig, zur Entwicklung einer Impfung die Diversität lokaler Parasitenpopulationen im Vorfeld genau zu untersuchen. Eine Übertragung auf verschiedene, sogar benachbarte Endemiegebiete muss so kritisch betrachtet werden.

Keine Assoziation von Parität und spezifischen Genotypen

Insbesondere Erstgebärende sind von einer *P.-falciparum*-Infektion betroffen (McGregor 1984; Diagne *et al.* 1997; Sullivan *et al.* 1999). Verschiedene Thesen versuchen, hierfür eine Erklärung zu geben. Eine besagt, dass Schwangere nur allmählich eine effektive Immunerkennung gegen speziell in der Schwangerschaft exprimierte parasitäre Antigene entwickeln (Fried *et al.* 1996; Fried *et al.* 1998; Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001). Antikörper, die sich gegen parasitäre Oberflächenstrukturen, wie zum Beispiel gegen bestimmte Varianten des *P.-falciparum*-Erythrozyten-Membran-Protein-1, richten, können erst während der ersten Schwangerschaften ausgebildet werden (Fried *et al.* 1996; Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001). Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten, die diese spezifischen Varianten des PfEMP-1 exprimieren, sequestrieren besonders in der ersten Schwangerschaft in der Plazenta. Bereits bei folgenden Schwangerschaften konnten effektive Antikörper gebildet werden, die eine plazentare Sequestration verhindern (Abb. 2) (Fried *et al.* 1996; Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001). Um diese These zu bestätigen, wurde analysiert, ob spezifische Genotypen im Vergleich zu Multiparae gehäuft bei Primiparae auftreten. Dies war nicht der Fall. Dagegen konnte in einer Studie von Schleiermacher *et al.* (2001) in Senegal eine Assoziation von Genotypen der Allelfamilie FC27 ausschließlich oder gehäuft bei Erstgebärenden nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit war die Allelfamilie FC27 besonders bei Primiparae mit einer Frühgeburtlichkeit assoziiert. Dies lässt darauf schließen, dass FC27 eine besondere Bedeutung bei plazentarer Malaria speziell für Primiparae hat.

Um den beschriebenen Zusammenhang weiter zu erforschen, sollte bei zukünftigen Untersuchungen überlegt werden, ob es sinnvoller wäre, parasitäre DNA für eine Genotypisierung direkt aus plazentarem Gewebe zu gewinnen, da möglicherweise nicht die

Gesamtheit aller Genotypen durch die Gewinnung einer plazentaren Blutprobe erkannt werden konnten. Andererseits könnten fälschlicherweise einzelne Genotypen als solche erkannt werden, die in der Plazenta sequestrieren, die eigentlich im Blut zirkulieren und dadurch die statistischen Analysen beeinflussen.

Vergleich der Genotypenverteilung plazentarer und peripherer *P.-falciparum*-Isolate

Ob eine Sequestration von *P. falciparum* in der Plazenta bei polyklonalen Infektionen durch alle oder nur einen Teil von koinfizierenden Genotypen geschieht, ist nicht bekannt. Deshalb wurden die Genotypen plazentar und peripher gewonnener Isolate miteinander verglichen. Es wurde angenommen, dass bei Schwangeren identische Genotypen in den zusammengehörenden Plazenta- und Blutisolaten erwartet werden können, wenn alle koinfizierenden Genotypen gleichmäßig in den untersuchten Isolaten verteilt sind. Das war aber nicht der Fall. Bei den meisten Frauen wurden neben identischen Genotypen unterschiedliche in den peripheren und dazugehörenden plazentaren Isolaten beobachtet (Abb.8). Nur bei 12% konnten absolut identische Genotypen nachgewiesen werden. Bei den Übrigen waren wenigstens in einer der beiden Isolate Genotypen, die in der anderen nicht bestimmt werden konnten. Diese Beobachtung war weitgehend unabhängig von der Parasitendichte, dem Alter und der Parität.

Eine mögliche Erklärung für den Nachweis unterschiedlicher Genotypen in zusammenhängenden Plazenta- und Blutisolaten wäre das Vorhandensein unterschiedlicher Subpopulationen, die einerseits im mütterlichen Blutkreislauf zirkulieren und andererseits Genotypen, die in der Plazenta sequestrieren. Dies würde für einen parallelen Verlauf einer Infektion von unterschiedlichen Genotypen sprechen und wäre vereinbar mit der Sequestration von spezifischen Subtypen in der Plazenta (Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001).

Der Nachweis identischer Genotypen in zusammengehörenden Proben könnte wie folgt erklärt werden: Ein früheres parasitäres Entwicklungsstadium eines *P.-falciparum*-Stammes könnte im peripheren Blut zirkulieren. Dagegen sequestriert derselbe Stamm in einem anderen parasitären Stadium in der Plazenta. Vermutlich sind zu diesem Zeitpunkt an der Oberfläche infizierter Erythrozyten Rezeptoren exprimiert, die als Liganden fungieren können. Dafür spricht, dass gewöhnlich eine *P.-falciparum*-Infektion aus einer Komposition verschiedener Entwicklungsstadien besteht. Im zeitlichen Verlauf sequestriert dabei ein Teil der Parasiten in der Plazenta, während ein anderer zirkuliert. Eine ähnliche Dynamik polyklonaler *P.-falciparum*-Infektionen konnten Färnert *et al.* (1997) bei Kindern in einer Longitudinalstudie in Tansania beobachten. Bei den täglichen Untersuchungen peripher gewonnener Isolate wurden unterschiedliche Genotypen nachgewiesen. Man ging davon aus, dass bestimmte Stämme im Kapillarbett sequestrierten und so nur zu einem bestimmten Zeitpunkt für die Untersuchung nicht zugänglich waren (Färnert *et al.* 1997). Entsprechende Beobachtungen wurden ebenfalls von Bruce *et al.*, (2000) in Papua Neuguinea bei Kindern gemacht. Langzeituntersuchungen bei

Schwangeren, die eine tägliche Dynamik der Infektion aufzeigen könnten, gibt es hierzu bis heute nicht. Eines der Hauptprobleme, die die Verwirklichung einer solchen Studie erschwert, ist die Gewinnung einer plazentaren Untersuchungsprobe während der Schwangerschaft.

Eine andere Erklärung für den Nachweis identischer Genotypen in beiden Isolaten wäre eine Kontamination der Plazenta mit Parasiten, welche zum Zeitpunkt der Geburt zufällig in der plazentaren Zirkulation vorhanden waren. Wie bereits erwähnt, sollten, um diesen Fehler bei zukünftigen Untersuchungen zu minimieren, Analysen direkt aus plazentarem Gewebe durchgeführt werden.

Zusammengefasst sprechen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit entweder für das Vorliegen unterschiedlicher Subpopulationen in der Plazenta und der peripheren Zirkulation oder für die Dynamik einer Infektion, wobei sich unterschiedliche Parasitenstadien zu unterschiedlichen Zeiten entweder in der Plazenta oder in der Peripherie aufhalten. So kann geschlussfolgert werden, dass die klonale Analyse von *P.-falciparum*-Infektionen ausschließlich aus einem Isolat (plazentares oder peripheres) nur ein unvollkommenes Bild von der Beschaffenheit und der Dynamik der Infektion mit *P. falciparum* in der Schwangerschaft wiedergibt. Dieses Ergebnis sollte in Zukunft bei epidemiologischen Untersuchungen in der Schwangerschaft berücksichtigt werden.

Parallel zu den hier beschriebenen Resultaten konnten kürzlich ähnliche Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen aus Malariagebieten in Senegal, Malawi und Gabun beschrieben werden (Kamwendo *et al.* 2002; Kassberger *et al.* 2002; Schleiermacher *et al.* 2002).

Sequestration einzelner Genotypen in der Plazenta

Wie beschrieben, wurde in den hier vorgestellten Untersuchungen erkannt, dass sowohl identische Genotypen, als auch nicht identische Genotypen in zusammengehörenden plazentaren und peripheren *P.-falciparum*-Isolaten nachgewiesen wurden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob in der gesamten Untersuchungsgruppe einige Genotypen häufiger primär plazentar oder primär peripher auftreten. Bis auf Parasiten der Allelfamilie RO33 sind Parasiten der Allelfamilien Mad20, K1, IC und FC öfter ausschließlich plazentar als ausschließlich peripher beobachtet worden. Wie im Verlauf dieser Arbeit noch diskutiert wird, ist die Multiplizität der Infektion plazentar gewonnener Isolate signifikant höher als die der peripheren Isolate. Somit scheint die Multiplizität der Infektion hierfür der eigentlich bestimmende Faktor gewesen zu sein.

Interessanter war, dass die Genotypen K1-07, Mad20-02, IC-10, IC-19, IC-20, FC27-08, FC27-12, FC27-16, FC27-18 und FC27-20 häufiger ausschließlich plazentar als ausschließlich peripher bestimmt werden konnten, einige sogar hochsignifikant (Tab.12). Eine direkte Erklärung für diesen Befund erscheint nach dem heutigen Wissensstand schwierig, da derzeit

keine direkte Assoziation dieser Gene mit Oberflächenstrukturen, die als Liganden fungieren könnten, beschrieben wurde. Nach allgemeiner Auffassung wird erst Stunden nach Invasion der Merozoiten das *P. falciparum*-Erythrozyten-Membran-Protein-1 (PfEMP-1) an der Oberfläche der infizierten Erythrozyten exprimiert (Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001). PfEMP-1 gilt derzeit als das wichtigste Protein, das bei Schwangeren an plazentare Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat A (CSA) und Hyaluronsäure (HA) binden kann und dadurch eine Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta erklärt (Fried *et al.* 1996; Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001; Fried *et al.* 2002). Diese Oberflächenproteine werden durch multiple Gene der *var*-Familie kodiert, die durch eine Expression verschiedener *var*-Gene ungleiche Varianten des PfEMP-1 mit unterschiedlichen Antigen- und Bindungseigenschaften hervorrufen (Beeson *et al.* 2001). Diese These ist in Abbildung 15 anschaulich dargestellt.

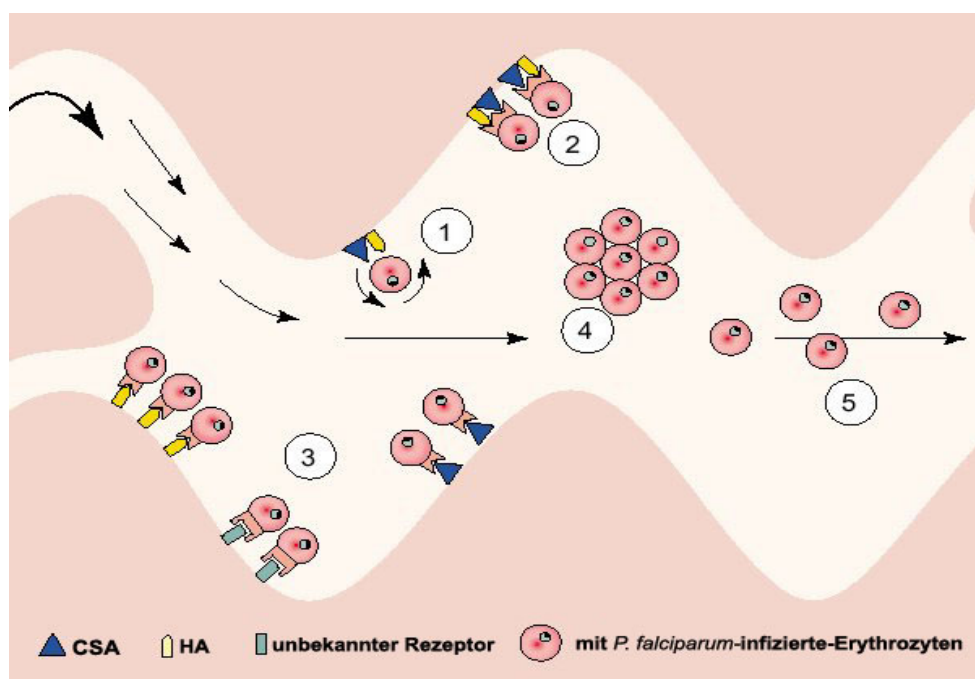


Abbildung 15: Mögliche Mechanismen einer Sequestration von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten

Mögliche Mechanismen, die für eine Sequestration von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten in der Plazenta verantwortlich sind. Infizierte Erythrozyten treten mit dem Blut in den intervillösen Spalt der Plazenta ein. Infizierte Erythrozyten, die an ihrer Oberfläche Liganden exprimieren, die an Rezeptoren wie Chondroitinsulfat-A (CSA) oder Hyaluronsäure (HA) binden können, umspülen diese (1), bis es zu einer Adhäsion an CSA und HA kommt (2). Alternativ kommt es zu einer Adhäsion an CSA oder HA oder bis heute unbekannte Rezeptoren (3). Infizierte Erythrozyten ohne schwangerschaftsspezifische Liganden verlassen die Plazenta und zirkulieren als Konglomerat (4) oder unabhängig voneinander im Gefäßsystem der Schwangeren (Beeson *et al.* 2001).

Es ist also unklar, ob K1-07, Mad20-02, IC-10, IC-19, IC-20, FC27-08, FC27-12, FC27-16, FC27-18 und FC27-20 selbst für eine Sequestration in der Plazenta verantwortlich sein können. Es wäre aber denkbar, dass sie einen Marker für andere Gene, wie zum Beispiel der *var*-Familie, darstellen, die eine Sequestration erklären würde. So konnte folgendes Phänomen durch Arieu *et al.* (2001) in einer Untersuchung in Französisch Guyana beobachtet werden. Dort waren spezifische *msp*-Allele mit einer schweren klinischen Malaria assoziiert. Außerdem gab es eine Assoziation dieser Allele mit funktional bedeutenden der *var*-Familie. Es wurde geschlussfolgert, dass *msp*-Allele in einem Verteilungsungleichgewicht mit funktional bedeutsamen Genen sein könnten. Dies würde die größere Virulenz einzelner Genotypen erklären (Arieu *et al.* 2001).

Zudem konnte bei *In-vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass neben infizierten Erythrozyten mit Bindungskapazitäten für CSA und HA auch infizierte Erythrozyten ohne diese an placentare Strukturen banden (siehe Abb. 15) (Beeson *et al.* 2000; Beeson *et al.* 2001). Daraus wurde geschlossen, dass bis heute unbekannte Faktoren, wie unbekannte Rezeptoren, neben PfEMP-1 eine Bedeutung für die Sequestration in der Plazenta haben. So wäre es möglich, dass Proteine, die durch *msp-1* und *msp-2* kodiert werden, selbst oder in Kombination mit anderen eine noch nicht erkannte Bedeutung für die Sequestration von *P. falciparum* in der Plazenta haben.

Sicherlich sind zur befriedigenden Beantwortung dieser Fragen in der Zukunft sowohl epidemiologische als auch experimentelle Untersuchungen nötig.

Assoziation einzelner Genotypen mit klinischen Manifestationsformen der Malaria

Die Annahme, dass spezifische Subtypen von *P. falciparum* eine höhere Virulenz besitzen als andere, ist seit Beginn der Malariaforschung Gegenstand wissenschaftlicher Überlegungen. So konnte bereits 1932 bei experimentellen Infektionen am Menschen gezeigt werden, dass spezielle Stämme von *P. falciparum* schwere Verläufe der Malaria induziert haben (James *et al.* 1932). In den letzten zehn Jahren wurde dieser Thematik eine erneute Aufmerksamkeit geschenkt (Gupta *et al.* 1994; Engelbrecht *et al.* 1995; Arieu *et al.* 2001). Die Identifikation spezifischer Virulenzfaktoren ist jedoch schwierig, da, wie zuvor beschrieben, die klinische Manifestation der *P.-falciparum*-Infektion ein breites Spektrum an Symptomen aufweisen kann. Diese Symptome können allein oder in Kombination miteinander auftreten.

Bei schwangeren Frauen sind die Anämie und der pathologische Schwangerschaftsverlauf mit vermindertem Geburtsgewicht und Frühgeburtslichkeit klinische Präsentationsformen der Malaria (Sullivan *et al.* 1999; Menendez *et al.* 2000; Mockenhaupt *et al.* 2000; Beck *et al.* 2001). Bei Nichtschwangeren wurde eine Assoziation von spezifischen *msp*-Allelen mit schweren Krankheitsverläufen der Malaria in Französisch Guayana und in Senegal beobachtet (Robert *et al.* 1996; Arieu *et al.* 2001). In der hier beschriebenen Arbeit konnte, ähnlich wie durch

Engelbrecht *et al.* (1995), in Papua Neu Guinea und durch Ofosu-Okoyere *et al.* (2001) in Ghana, eine Assoziation der Genotypen der Allelfamilie FC27 mit einer klinischen Malaria beobachtet werden. So konnte in multivariaten Analysen gezeigt werden, dass Frauen, die plazentare Stämme mit FC27 aufwiesen, ein mehr als doppelt so hohes Risiko für ein Frühgeburts hatten wie Frauen, die nicht mit diesen Stämmen infiziert waren. Bei Primiparae war das Risiko sogar mehr als dreimal so hoch. In univariater Analyse konnte ebenfalls eine Assoziation zur Anämie und zu einem LBW gezeigt werden. Ob diese Assoziation durch den Genlocus selbst oder durch das kombinierte Auftreten verschiedener Gene bedingt ist, bleibt offen. Das wurde bereits bei der plazentaren Sequestration einzelner Genotypen vermutet. Da aber den Merozoiten-Oberflächen-Proteinen bei der erythrozytären Invasion der Parasiten eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird (Ariey *et al.* 2001), könnte angenommen werden, dass Parasiten, die spezifische MSP-Proteine, wie hier Oberflächenproteine, die durch Allele der Allelfamilie FC27 kodiert werden, mit einer höheren Effizienz neue Erythrozyten befallen und ein schnelles Ansteigen der Parasitendichten hervorrufen.

Es kann vermutet werden, dass es zu einer klinischen Manifestation der Malaria kommt, bevor effektive Immunmechanismen die Infektion kontrollieren (James *et al.* 1932; Gupta *et al.* 1994; Chotivanich *et al.* 2000). Bedingt durch eine verstärkte Hämolyse, könnte es dadurch zu einer Anämie kommen (Mockenhaupt *et al.* 2000; Beck *et al.* 2001).

Andererseits könnte angenommen werden, dass bei einer plazentaren Infektion von Stämmen, die FC27 aufweisen, vermehrt Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α und IL-2 produziert werden. Einige Arbeiten beschreiben, dass spezifische Glykosaminoglykane des *P. falciparum* einen lipopolysaccharidähnlichen Effekt haben, der Monozyten zur vermehrten Produktion von TNF- α anregt (Schofield *et al.* 1994; Fievet *et al.* 2001). Zudem waren in einer Studie in Senegal Stämme, die spezifische *msp*-Allele aufwiesen, mit einem erhöhten Spiegel an TNF- α assoziiert (Robert *et al.* 1996). Der Überproduktion von Zytokinen wird ebenfalls eine plazentaschädigende Wirkung zugeschrieben. Die Folge dessen wäre eine Störung des Sauerstoff- und Nährstofftransportes, die zu einer intrauterinen Entwicklungsstörung mit vermindertem Geburtsgewicht führen könnte (Menendez *et al.* 2000; Rogerson *et al.* 2003). Andererseits kann ein erhöhter Spiegel an TNF- α vorzeitige Wehen induzieren, die zu einer Frühgeburt führen (Silver *et al.*, 1994).

Die hier gewonnenen Ergebnisse können als einer der ersten Schritte zur Aufklärung der klinischen Bedeutung des FC27 gewertet werden. Das Ausmaß einer derartigen Assoziationen sollte Inhalt weiterer experimenteller Untersuchungen sein.

4.2.3 Multiplizität der Infektion mit *P. falciparum*

Eine Reihe von Studien, die sich mit der klonalen Zusammensetzung von *P.-falciparum*-Infektionen auseinandersetzten, haben gezeigt, dass es eine Assoziation zwischen der Multiplizität der Infektion und der klinischen Manifestation der Malaria gibt (Mercereau-Puijalon 1996; Roper *et al.* 1998; Felger *et al.* 1999). Andere Arbeiten beschreiben, dass die Multiplizität der Infektion einen wichtigen Faktor bei der Entwicklung von Abwehrmechanismen und einer körpereigenen Immunität darstellt (Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Beck *et al.* 2001). Es wurden Zusammenhänge zwischen der Erregertransmission, dem Alter (Felger *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001), der Parasitendichten sowie der Einnahme von antiparasitären Medikamenten dargestellt (Beck *et al.* 2001). Bei Frauen wurde eine Assoziation zur Schwangerschaft und Anzahl der Schwangerschaften beschrieben (Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001).

Multiplizität der Infektion

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Gebieten mit geringer Transmission die Multiplizität der Infektion niedriger ist als in Hochendemiegebieten. Beispielsweise hat im Sudan, einem Gebiet, wo die Malaria nur epidemisch auftritt, die Multiplizität der Infektion einen Wert von nur 1,3 (Babiker *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu wird in Hochendemiegebieten von Tansania oder Senegal eine Multiplizität der Infektion von 3,9 bzw. 4,8 beschrieben (Ntoumi *et al.* 1995; Smith *et al.* 1999). In verschiedenen Gebieten mit intensiver Malariaübertragung liegt somit die Prävalenz polyklonaler Infektionen bei Kindern, nichtschwangeren Erwachsenen und Schwangeren zwischen 60 und 85% (Babiker *et al.* 1997; Beck *et al.* 2001; Schleiermacher *et al.* 2001). Im holoendemischen Malariagebiet von Agogo zeigte sich bei der vorliegenden Untersuchung, dass ebenfalls die Mehrzahl der Gebärenden von polyklonalen Infektionen mit *P. falciparum* betroffen war. Die in der vorliegenden Untersuchung aus einem peripher gewonnenen Isolat ermittelte Prävalenz von 72% entsprach ungefähr der Prävalenz von 68%, die zuvor durch Beck *et al.* (2001) im Untersuchungsgebiet ermittelt wurde. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden nachgewiesen werden, dass die Prävalenz polyklonaler *P.-falciparum*-Infektionen plazentar gewonnener Isolate mit 81% signifikant höher als die peripher gewonnener Isolate war. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Multiplizität der Infektion in der Plazenta mit 2,91 im Vergleich zu peripheren Isolaten mit 2,59 signifikant höher war, wobei beide Größen direkt miteinander korrelierten. Die erhöhte Multiplizität plazentarer Isolate im Vergleich zur Multiplizität peripherer Isolate könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten, die spezifische Oberflächenproteine exprimieren, in der Plazenta sequestrieren (Fried *et al.* 1996; Beeson *et al.* 2001).

Multiplizität der Infektion und Parasitendichte

In der vorliegenden Arbeit konnte erkannt werden, dass die Parasitendichte einer der wichtigsten Faktoren ist, der die Multiplizität der Infektion beeinflusst. Diese Abhängigkeit wurde sowohl für plazentare als auch periphere Isolate nachgewiesen (Tab. 19-20). Eine derartige Abhängigkeit wurde ebenfalls in anderen Arbeiten beschrieben. Unter anderem wiesen Peyerl-Hoffmann *et al.* (2001) eine solche Assoziation in Endemiegebieten in Westuganda bei Erwachsenen nach (Peyerl-Hoffmann *et al.* 2001). Felger *et al.* (1999) und Smith *et al.* (1999) zeigten dies bei Kindern in Tansania. In Ghana und Senegal beobachteten Beck *et al.* (2001) und Schleiermacher *et al.* (2001) bei schwangeren Frauen, dass die Multiplizität der Infektion von der Parasitendichte beeinflusst wird. Lediglich in einer Studie in Mosambik konnten Saute *et al.* (2002) kein klares Abhängigkeitsmuster zwischen der Parasitendichte und Multiplizität der Infektion bei Schwangeren nachweisen. Vielleicht liegt der Grund hierfür in der relativ kleinen Zahl ($n = 156$) an untersuchten Fällen. Saute *et al.* (2002) diskutieren dagegen, dass möglicherweise die HIV-Durchseuchung, die mit einer HIV-Seroprävalenz von 15% im mosambikanischen Untersuchungsgebiet einen beeinflussenden Faktor für dieses Ergebnis darstellt. Jedoch kann angenommen werden, dass die Prävalenz einer HIV-Infektion in den anderen afrikanischen Untersuchungsgebieten genau so hoch ist.

Derzeit versuchen verschiedene Thesen, die Abhängigkeit zwischen der Multiplizität der Infektion und der Parasitendichte zu erklären: Felger *et al.* (1999) behaupten beispielsweise, dass eine hohe Multiplizität der Infektion bei hohen Parasitendichten die Folge einer hohen Nachweiswahrscheinlichkeit verschiedener parasitärer Genotypen darstellt. Eine niedrige Multiplizität der Infektion bei niedrigen Parasitendichten ist nach dieser Auffassung auf die Sensitivität der Nachweismethode zurückzuführen. Diese Ansicht spricht jedoch gegen die von Snounou *et al.* (1999) zuvor gezeigte hohe Sensitivität der geschachtelten PCR-Methode. So könnte alternativ angenommen werden, dass hohe Parasitendichten ein Resultat aus einer Vielzahl von Super- und Koinfektionen mit verschiedenen *P.-falciparum*-Genotypen darstellen. Eine hohe Infektionsrate führt zu einer hohen Multiplizität der Infektion und erst als Folge dessen zu hohen Parasitendichten. Diese These wird ebenfalls von Schleiermacher *et al.* (2001) vertreten, die in einer Longitudinalstudie die Bedeutung der Multiplizität der Infektion in einem senegalesischen Dorf bei Frauen vor, während und nach einer Schwangerschaft untersuchten.

Multiplizität der Infektion und Schwangerschaft

Schleiermacher *et al.* (2001) konnten in der oben beschriebenen Studie nachweisen, dass eine Schwangerschaft per se mit einer erhöhten Multiplizität der Infektion assoziiert ist. Diese Assoziation erklärten sie mit der in der Schwangerschaft auftretenden Immunsuppression. Die verminderte zelluläre Immunantwort während einer Schwangerschaft (Weinberg *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1996) wurde dafür verantwortlich gemacht, dass es zu einer verminderten Kontrolle

präerythrozytärer Parasitenstadien kommt. Eine große Anzahl an Klonen erreichen nach der Auffassung von Schleiermacher *et al.* (2001) das erythrozytäre Stadium. Außerdem ist die Immunantwort gegen erst kürzlich aufgenommene Parasiten (z.B. schwangerschaftsspezifische Parasiten) eingeschränkt. Die Folge ist eine erhöhte Multiplizität der Infektion, die zu einer hohen Parasitendichte führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Erstgebärende im Vergleich zu Mehrfachgebärenden eine signifikant höhere Multiplizität der Infektion aufwiesen. Entsprechend fiel die Multiplizität der Infektion signifikant mit der Parität (Tab. 23-24). Dieses Ergebnis entspricht der Untersuchung von Beck *et al.* (2001), die ebenfalls eine klare Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion von der Parität nachweisen konnten. Dagegen konnte in der schon zuvor zitierten Untersuchung von Saute *et al.* (2002) eine derartige Assoziation in Mosambik nicht dargestellt werden. Als Erklärung für dieses Ergebnis in Mosambik machen Saute *et al.* (2002) wiederum den Einfluss von HIV auf eine *P.-falciparum*-Infektion verantwortlich. Wie Saute *et al.* (2002) beschreiben, beeinflusst eine Infektion mit HIV die für die Malaria sonst typischen Assoziationen von Alter, Parasitendichten und klinischer Manifestation.

Abgesehen davon, dass die Schwangerschaft an sich mit einer hohen Multiplizität der Infektion assoziiert ist, ergaben die Studien von Schleiermacher *et al.* (2001), dass bei Schwangeren das Alter neben der Parität einen starken Einfluss auf die Multiplizität der Infektion hat. Dieser Einfluss konnte auch in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden.

Multiplizität der Infektion und Parität/Alter

Die Altersabhängigkeit der Multiplizität der Infektion wurde in verschiedenen Hochendemiegebieten beobachtet. In Tansania wurde zum Beispiel gezeigt, dass in den ersten Lebensmonaten bei den Untersuchungen die Multiplizität der Infektion mit < 2 niedrig war (Felger *et al.*, 1999). Im Kleinkindalter stieg die Multiplizität der Infektion an und erreichte bei einem Alter von fünf Jahren ihr Maximum (ca. 5 Genotypen) (Beck *et al.*, 1997). Mit steigendem Alter fiel die Multiplizität der Infektion und stellte sich bis ins hohe Alter auf einen Wert von ca. 3 Genotypen ein (Smith *et al.*, 1999). Eine hohe Multiplizität der Infektion war bei Kleinkindern mit klinischen Manifestationen der Malaria assoziiert. Dagegen schien eine hohe Multiplizität der Infektion bei älteren Kindern und Erwachsenen einen Schutz vor klinischer Malaria zu geben (Robert *et al.* 1996; Beck *et al.* 1997; Smith *et al.* 1999).

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen waren im Vergleich zu älteren Frauen jüngere von einer erhöhten Multiplizität der Infektion betroffen. Diese Beobachtungen konnten sowohl bei plazentar als auch bei peripher gewonnenen Isolaten gemacht werden (Tab. 21-22). Jedoch muss betont werden, dass die beschriebene Abhängigkeit der Multiplizität der Infektion zur Parität und zum Alter der Gebärenden aufgrund der Kolinearität von Multiplizität und Parasitendichte der Infektion nicht unabhängig voneinander gesehen werden können, da

entsprechend der Multiplizität der Infektion jüngere Frauen und Primiparae signifikant höhere Parasitendichten aufwiesen als ältere Frauen und Multiparae. Ein signifikanter Einfluss der Parität sowie des Alters auf die Korrelation von der Multiplizität der Infektion und der Parasitendichte konnte in der hier dargestellten Untersuchung ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Bei Nichtschwangeren dagegen, insbesondere bei Kindern, konnte dargestellt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Stärke der Korrelation von der Multiplizität der Infektion und der Parasitendichte gab. Durch Untersuchung der Korrelation schloss man auf den Status einer entwickelten Immunität. So wurde unter anderen von Beck *et al.* (1997); Smith *et al.*, (1999) und Felger *et al.* (1999) diskutiert, dass eine hohe positive Korrelation mit einem gering ausgeprägten malariaspezifischen Immunstatus einhergeht. Dies wurde vor allem bei Kleinkindern beobachtet. Mit zunehmendem Alter fiel die Korrelation und wurde bei jungen Erwachsenen sogar negativ. Man nahm an, dass durch Prämunition die Infektionen kontrolliert wurden. Auf diese Weise konnten durch eine hohe Multiplizität der Infektion hohe Parasitendichten vermieden werden (Ntomie *et al.* 1995; Beck *et al.* 1997; Smith *et al.* 1999; Felger *et al.*, 1999). Sollte es als Ausdruck für eine sich entwickelnde Immunität möglich sein, dieses Model auf plazentare *P. falciparum*-Infektionen zu übertragen, müsste die positive Korrelation zwischen der Multiplizität der Infektion und der Parasitendichte mit der Parität fallen. Frauen, die mit zunehmender Anzahl an vorangegangenen Schwangerschaften einem immer breiterem Spektrum an spezifischen Subtypen von *P. falciparum* ausgesetzt sind, entwickeln wie ältere Kinder effiziente Immunmechanismen, die eine Infektion kontrollieren und so hohe Parasitendichten vermeiden. Diese Hypothese würde eine Studie von Maubert *et al.* (1999) stützen, die beschreibt, dass mit vorangegangenen Schwangerschaften die Prävalenz von Antikörpern gegen Stämme, die mit einer Schwangerschaft assoziiert waren, stiegen (Maubert *et al.* 1999).

Nach den Ergebnissen der hier beschriebenen Studie wäre jedoch ebenfalls zu diskutieren, ob Immunreaktionen bei Schwangeren gleichzeitig die Multiplizität der Infektion und die Parasitendichte senken. Gestützt wird diese These dadurch, dass in der vorliegenden Studie weder das Alter der Patientin noch die Parität die Korrelation von Multiplizität der Infektion und Parasitendichte beeinflussten (Abb. 10).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Mehrfachgebärenden, die eine erhöhte Multiplizität der Infektion aufwiesen, nicht signifikant häufiger zu einer Frühgeburt des Kindes kam. Dagegen konnte bei Primiparae im Vergleich zu monoklonalen Infektionen bei einer plazentaren Infektion von 2, 3 oder mehr Klonen ein um den Faktor 10 bis 13 erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt beobachtet werden (Tab. 35, 36). Bei Primiparae könnte es folglich, bedingt durch eine schwächer ausgeprägte Immunität, zu einer höheren Sequestationsrate in der Plazenta kommen (Abb. 4). Diese ist dadurch bedingt, dass in der ersten Schwangerschaft

die primäre Auseinandersetzung des Immunsystems mit bislang unbekannten Parasitenstämmen stattfindet. Mit zunehmender Anzahl der Schwangerschaften erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass das Immunsystem bereits mit Antigenstrukturen, die für eine Sequestration verantwortlich sind, bekannt ist (Ricke *et al.* 2000). Deshalb kann bei Primiparae eine hohe Multiplizität der Infektion zu hohen Parasitendichten in der Plazenta führen. Anhalt dafür, dass die Multiplizität der Infektion neben der Parasitendichte eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Frühgeburt bei einer plazentaren Malaria spielt, geben die Ergebnisse der multivariaten Analysen (Tab. 35, 36). Zudem zeigte sich auch bei submikroskopischen plazentaren Infektionen eine Assoziation zwischen hoher Multiplizität und erhöhter Frühgeburtsrate (Tab. 37).

Eine vergleichbare Beobachtung konnte in der zuvor beschriebenen Arbeit von Beck *et al.* (2001) gemacht werden. Dort wurde eine Assoziation von hoher Multiplizität der Infektion mit einer Anämie nur bei Frauen bis zur vierten Schwangerschaft nachgewiesen. Bei Frauen mit einer größeren Zahl vorangegangener Schwangerschaften konnte eine derartige Assoziation nicht mehr nachgewiesen werden. Beck *et al.* (2001) machten ebenfalls die entwickelte Immunität für diese Beobachtungen verantwortlich. In der hier vorgestellten Arbeit konnte eine Assoziation von hoher Multiplizität der Infektion mit einer moderaten Anämie (Hb < 9 g/dl) lediglich in univariater Analyse bestätigt werden (Tab. 30). In multivariater Analyse zeigte sich jedoch, dass die Parasitendichte der entscheidende Risikofaktor für das Vorliegen einer Anämie war (Tab. 30). Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten vieler Natur sein. Einerseits muss das Ergebnis von Beck *et al.* (2001) kritisch betrachtet werden, da wahrscheinlich durch die verwendete PCR-Methode nur ein Teil der Genotypen nachgewiesen werden konnten. Dies kann behauptet werden, da Beck *et al.* (2001) im Vergleich zu anderen für ein holoendemisches Malariagebiet eine zu niedrige Diversität von *P. falciparum* feststellten. Außerdem kann vermutet werden, dass der Einfluss der Parasitendichten auf das Vorliegen einer Anämie unterschätzt wurde. Andererseits führten Beck *et al.* (2001) ihre Analysen auf der Basis von peripher gewonnenen Isolaten durch, was einen Vergleich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit erschwert. Neben Beck *et al.* (2001) untersuchten auch Saute *et al.* (2002) den Einfluss der Multiplizität der Infektion auf eine Anämie. Diese Arbeitsgruppe konnte keine derartige Assoziation feststellen. Hierfür machen Saute *et al.* (2002) wiederum die hohe Durchseuchung mit HIV im Untersuchungsgebiet verantwortlich.

Um letztendlich mehr Klarheit über die Bedeutung der Multiplizität der Infektion auf die Entwicklung einer natürlichen Immunität bei Schwangeren zu bekommen, sollten in der Zukunft weitere epidemiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

4.3 Schlussfolgerung

In den letzten Jahren konnte durch moderne molekularbiologische Methoden wie zum Beispiel die PCR ein großer Wissenszuwachs im Verständnis um die Pathophysiologie der Malaria gewonnen werden. Jedoch bleiben viele Fragen unbeantwortet. Welche Bedeutung beispielsweise die Multiplizität der Infektion auf die Entwicklung einer Immunität bei Schwangeren hat, konnte nicht bis ins Detail geklärt werden. Warum Frauen mit einer höheren Anzahl an vorangegangenen Schwangerschaften seltener von mit *P. falciparum* assoziierten Syndromen (z.B. pathologische Schwangerschaftsverläufe) betroffen sind, ist bis heute nur teilweise verstanden. Ebenso gibt es nur wenig befriedigende Antworten, die die komplexen Interaktionen von Parasit und Wirt, wie beispielsweise die Sequestration von *P. falciparum* in der Plazenta, erklären. Die Einfachheit, mit der infiziertes Plazentagewebe nach einer Geburt gewonnen werden kann, gibt hier eine einmalige Gelegenheit, den Parasiten und seine spezifischen pathologischen Mechanismen zu erforschen. Aus diesem noch zu gewinnenden Wissen können in der Zukunft neue Interventionen, wie Impfungen oder Chemotherapeutika, zur Behandlung der Malaria in der Schwangerschaft erwachsen. Die vorliegende Arbeit kann in diesem Zusammenhang als ein kleiner Baustein dienen.

So konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Genotypisierung von *P. falciparum* aus zusammengehörenden plazentar und peripher gewonnenen Isolaten gezeigt werden, dass *P. falciparum* im Untersuchungsgebiet eine hohe genetische Diversität besitzt. Es wurde deutlich, dass die Multiplizität der Infektion plazentarer Isolate deutlich höher war als die von peripher gewonnenen Isolaten. Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Verteilungsprofile der Genotypen zusammengehörender plazentarer und peripherer Isolate grundlegend unterscheiden. Dies ist insofern ein Ergebnis von großer Tragweite, da in der Vergangenheit bei einer Vielzahl von Studien dieser Problematik keine oder nur unzureichende Beachtung geschenkt wurde. Es kann hier sogar vermutet werden, dass auch bei nichtschwangeren Patienten die Sequestration des Parasiten in Kompartimenten, die dem Untersucher nicht zugänglich sind, eine größere Rolle spielt als bisher angenommen. Seit die PCR-Genotypisierung ein wichtiges Handwerkszeug bei der Malariakontrolle zur Untersuchung von parasitären Resistenzentwicklungen gegen antiparasitäre Medikamente oder einer Vaccine darstellt, sind möglicherweise bei der Untersuchung peripher gewonnener Isolate nicht alle an einer Infektion beteiligten Genotypen erkannt worden. Es ist durchaus möglich, dass es aus diesem Grund in der Vergangenheit sogar zu Fehlinterpretationen gekommen ist. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass, entsprechend der Fragestellung, peripher gewonnene Isolate nicht in jedem Fall ein vollständiges Bild der *P.-falciparum*-Infektion wiedergeben können. Daraus ergibt sich, dass in der Zukunft nach Strategien und Methoden gesucht werden sollte, dieser Problematik entgegenzuwirken.

Die Multiplizität der Infektion ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung einer natürlichen Immunität. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es bei Gebärenden komplexe Zusammenhänge zwischen der Multiplizität der Infektion und dem Alter, der Parität und der Parasitendichte gibt. Um diese Zusammenhänge weiter zu beleuchten, sind in der Zukunft weiterführende Untersuchungen zu dieser Thematik nötig. Derartige prospektive Untersuchungen sollten über mehrere Jahre gehen, wobei bei einer großen Anzahl an Patientinnen Untersuchungen sowohl vor, während und nach einer Schwangerschaft durchgeführt werden sollten. Denn auch hierdurch können aus einem besseren Verständnis neue und effektive Regime zur Behandlung der Malaria bei Schwangeren erarbeitet werden.

Weithin konnte in der hier vorgestellten Studie gezeigt werden, dass die Allelfamilie FC 27 in multivariater Analyse mit einer Frühgeburtlichkeit assoziiert war. Eine Assoziation zu einem verminderten Geburtsgewicht und einer Anämie konnte zumindest in univariater Analyse gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind als erste Schritte zu werten, die eine Assoziation bestimmter Genotypen mit erhöhter Morbidität bei Schwangeren versuchen zu erklären. Zukünftige epidemiologische Studien müssen derartige Ergebnisse bestätigen. Experimentelle Untersuchungen sollten versuchen, die Pathophysiologie zu erklären. Durch die Einmaligkeit des Plazentagewebes kann *P. falciparum* nach einer Geburt in seiner natürlichen Umgebung erforscht werden.

Um die Malaria, als eine der bedeutendsten parasitären Infektionskrankheiten der Menschheit, zu beherrschen, ist es dringend notwendig, noch umfangreichere Erkenntnisse über *P. falciparum* und die menschliche Immunabwehr zu gewinnen. Es lässt hoffen, dass diese Bemühungen intensiviert werden; denn es gibt dringenden medizinischen Bedarf, Frauen und ihre Kinder vor einer Malaria in der Schwangerschaft zu schützen.

5 Zusammenfassung

Die Malaria ist heute noch immer die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit des Menschen. Hiervon sind in Endemiegebieten neben Kleinkindern insbesondere schwangere Frauen betroffen. *P. falciparum* weist eine hohe genetische Diversität auf. So sind in Endemiegebieten Infektionen mit *P. falciparum* in der Regel polyklonal. Man spricht in diesen Fällen von multiplen Infektionen bzw. von der Multiplizität der Infektion. Bei Schwangeren sequestrieren mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten, die spezifische Oberflächenproteine exprimieren, in der Plazenta. Hierdurch bedingt können pathologische Schwangerschaftsverläufe klinische Manifestationsformen der Malaria darstellen. Zudem wird bei infizierten Schwangeren gehäuft eine Anämie beobachtet. Bei Kindern und Erwachsenen wird vermutet, dass die Multiplizität einer Infektion einen entscheidenden Faktor bei der Entwicklung einer natürlichen Immunität darstellt. Bei Schwangeren gibt es hierzu nur wenige Untersuchungen.

Um die Diversität von *P. falciparum* und die Multiplizität der Infektion bei schwangeren Frauen zu erforschen, wurden in einer Querschnittsstudie im holoendemischen Malariagebiet von Agogo in Ghana über den Zeitraum von einem Jahr 474 Gebärende mit einer nachgewiesenen plazentaren Infektion von *P. falciparum* untersucht. Hierzu wurden die Gene, die für das „Merozoiten-Oberflächen-Protein-1“ (*msp-1*) und „Merozoiten-Oberflächen-Protein-2“ (*msp-2*) kodieren, aus peripher und plazentar gewonnen Isolaten typisiert.

Plazentar gewonnene Isolate waren im Vergleich zu peripher gewonnenen mit einer signifikant höheren Prävalenz an polyklonalen Infektionen und einer höheren Multiplizität der Infektion assoziiert. Die höchste Multiplizität der Infektion wurde bei Erstgebärenden und jüngeren Patientinnen beobachtet. Mit zunehmendem Alter und einer höheren Anzahl an vorangegangenen Schwangerschaften fielen signifikant sowohl die Multiplizität der Infektion als auch die Parasitendichte. Zudem wurde eine hohe Korrelation zwischen der Multiplizität der Infektion und der Parasitendichte nachgewiesen. Weder das Alter noch die Parität beeinflussten diese Korrelation. Der Einfluss von Alter und Parität auf die Multiplizität der Infektion konnte somit nicht unabhängig von der Parasitendichte nachgewiesen werden. Multivariate Analysen zeigten aber, dass es unabhängig von der Parasitendichte bei plazentaren Infektionen mit zwei und mehr als zwei Klonen im Vergleich zu monoklonalen plazentaren Infektionen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer Frühgeburt kam. Dies betraf insbesondere Erstgebärende und Frauen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen.

Ob bei polyklonalen Infektionen eine Sequestration von *P. falciparum* in der Plazenta durch alle oder nur durch einen Teil der zahlreichen Genotypen geschieht, die an einer Infektion bei Schwangeren beteiligt sind, ist nicht entgültig geklärt. Es wurden aus zusammengehörenden plazentar und peripher gewonnenen *P.-falciparum*-Isolaten die Verteilungsmuster der Genotypen verglichen. Zwar korrelierte die Multiplizität der Infektion plazentarer und peripherer

Isolate, die Genotypenmuster der Plazenta und der Peripherie waren jedoch deutlich unterschiedlich. Nur in 12% der Fälle konnte eine Genotypisierung eines peripher gewonnenen Isolates das klonale Gesamtbild der Infektion nachweisen. In 67% der Fälle waren neben identischen Genotypen wenigstens in einem der beiden Isolate unterschiedliche Genotypen nachweisbar. Einzelne spezifische Genotypen traten in der gesamten Untersuchungsgruppe öfter in der Plazenta als in der peripheren Blutprobe auf. Bei Frauen, die mit den Genotypen der Allelfamilie FC27 infiziert waren, lagen signifikant häufiger klinischen Manifestationen der Malaria vor. So konnte in multivariaten Analysen eine Assoziation zwischen FC27 und einer Frühgeburtlichkeit nachgewiesen werden. Darüber hinaus war FC27 zumindest in univariater Analyse mit einer Anämie und einem verminderten Geburtsgewicht assoziiert. Dies konnte insbesondere für Primiparae und für Gebärende mit submikroskopischen placentaren Infektionen beobachtet werden.

Die in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse bestätigen, dass bei schwangeren Frauen insbesondere bei Erstgebärenden klinische Manifestationen einer Infektion mit *P. falciparum* häufig auftreten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es komplexe Zusammenhänge zwischen der Parasitendichte einer Infektion, der Multiplizität der Infektion, der Infektion durch spezifische Genotypen, dem Alter und der Parität bei schwangeren Frauen gibt. Ob bei schwangeren Frauen die Multiplizität der Infektion letztendlich einen Einfluss auf die Entwicklung einer Immunität oder auf komplizierte Infektionsverläufe hat, bedarf in der Zukunft weiterführender Untersuchungen.

Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass bei Schwangeren zur Untersuchung bestimmter Fragestellungen eine Analyse von sowohl plazentar wie auch peripher gewonnenen Isolaten notwendig ist. Es kann bestätigt werden, dass bestimmte Subtypen von *P. falciparum* im Vergleich zu anderen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in der Plazenta sequestrieren und mit komplizierteren Infektionsverläufen assoziiert sind. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Verbreitung einzelner Genotypen von lokalen Faktoren abhängig ist. Um letztlich die pathophysiologischen Zusammenhänge für die hier beschriebenen Beobachtungen zu klären, sind ebenfalls in der Zukunft weiterführende Untersuchungen nötig.

Anhang

Literaturverzeichnis

- Ademowo, O. G., A. G. Falusi and O. O. Mewoyeka (1995). "Prevalence of asymptomatic parasitaemia in an urban and rural community in south western Nigeria." Cent Afr J Med **41**(1): 18-21.
- al-Yaman, F., B. Genton, J. Taraika, R. Anders, et al. (1997). "Cellular immunity to merozoite surface protein 2 (FC27 and 3D7) in Papua New Guinean children. Temporal variation and relation to clinical and parasitological status." Parasite Immunol **19**(5): 207-14.
- Ariey, F., D. Hommel, C. Le Scanf, J. B. Duchemin, et al. (2001). "Association of severe malaria with a specific Plasmodium falciparum genotype in French Guiana." J Infect Dis **184**(2): 237-41.
- Babiker, H. A., J. Lines, W. G. Hill and D. Walliker (1997). "Population structure of Plasmodium falciparum in villages with different malaria endemicity in east Africa." Am J Trop Med Hyg **56**(2): 141-7.
- Babiker, H. A., L. C. Ranford-Cartwright and D. Walliker (1999). "Genetic structure and dynamics of Plasmodium falciparum infections in the Kilombero region of Tanzania." Trans R Soc Trop Med Hyg **93** Suppl 1: 11-4.
- Babiker, H. A., G. Satti and D. Walliker (1995). "Genetic changes in the population of Plasmodium falciparum in a Sudanese village over a three-year period." Am J Trop Med Hyg **53**(1): 7-15.
- Bates, M. D., S. Quenby, K. Takakuwa, P. M. Johnson, et al. (2002). "Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?" Hum Reprod **17**(9): 2439-44.
- Beck, H. P., I. Felger, W. Huber, S. Steiger, et al. (1997). "Analysis of multiple Plasmodium falciparum infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66." J Infect Dis **175**(4): 921-6.
- Beck, S., F. P. Mockenhaupt, U. Bienzle, T. A. Eggelte, et al. (2001). "Multiplicity of Plasmodium falciparum infection in pregnancy." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 631-6.
- Beeson, J. G., J. C. Reeder, S. J. Rogerson and G. V. Brown (2001). "Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria." Trends Parasitol **17**(7): 331-7.
- Beeson, J. G., S. J. Rogerson, B. M. Cooke, J. C. Reeder, et al. (2000). "Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria." Nat Med **6**(1): 86-90.
- Borre, M. B., M. Dziegiel, B. Høgh, E. Petersen, et al. (1991). "Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle." Mol Biochem Parasitol **49**(1): 119-31.
- Bottius, E., A. Guanzirolli, J. F. Trape, C. Rogier, et al. (1996). "Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction." Trans R Soc Trop Med Hyg **90**(1): 15-9.
- Brabin, B. J., M. Ginny, J. Sapau, K. Galme, et al. (1990). "Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area in Papua New Guinea." Ann Trop Med Parasitol **84**(1): 11-24.
- Browne, E. N., E. Frimpong, J. Sievertsen, J. Hagen, et al. (2000). "Malariometric update for the rainforest and savanna of Ashanti region, Ghana." Ann Trop Med Parasitol **94**(1): 15-22.
- Bulmer, J. N., F. N. Rasheed, N. Francis, L. Morrison, et al. (1993). "Placental malaria. I. Pathological classification." Histopathology **22**(3): 211-8.

- Bulmer, J. N., F. N. Rasheed, L. Morrison, N. Francis, et al. (1993). "Placental malaria. II. A semi-quantitative investigation of the pathological features." Histopathology **22**(3): 219-25.
- Carcy, B., S. Bonnefoy, M. Guillotte, C. Le Scanf, et al. (1994). "A large multigene family expressed during the erythrocytic schizogony of *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **68**(2): 221-33.
- Carlier, Y. and C. T. . (1995). "Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites." Parasitol Today **55**(11): 94-99.
- Carlson, J., H. Helmbj, A. V. Hill, D. Brewster, et al. (1990). "Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies." Lancet **336**(8729): 1457-60.
- Chappel, J. A. and A. A. Holder (1993). "Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1." Mol Biochem Parasitol **60**(2): 303-11.
- Chotivanich, K., R. Udomsangpetch, J. A. Simpson, P. Newton, et al. (2000). "Parasite multiplication potential and the severity of *Falciparum* malaria." J Infect Dis **181**(3): 1206-9.
- Clendennen, T., G. Long and J. Baird (1995). "QBC and Giemsa-stained thick blood films: diagnostic perfomance of laboratory technologists." Trans Roy Soc Trop Med Hyg **66**(87): 649-653.
- Contamin, H., T. Fandeur, S. Bonnefoy, F. Skouri, et al. (1995). "PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*." J Clin Microbiol **33**(4): 944-51.
- Cornet, M., J. Y. Le Hesran, N. Fievet, M. Cot, et al. (1998). "Prevalence of and risk factors for anemia in young children in southern Cameroon." Am J Trop Med Hyg **58**(5): 606-11.
- Creasey, A., B. Fenton, A. Walker, S. Thaithong, et al. (1990). "Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation." Am J Trop Med Hyg **42**(5): 403-13.
- Davison, B. B., F. B. Cogswell, G. B. Baskin, K. P. Falkenstein, et al. (1998). "*Plasmodium coatneyi* in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as a model of malaria in pregnancy." Am J Trop Med Hyg **59**(2): 189-201.
- Deloron, P. and B. Maubert (1995). "[Immunological interactions between malaria and pregnancy]." Med Trop (Mars) **55**(4 Suppl): 67-8.
- Desowitz, R. S. and G. Buchbinder (1992). "The absence of *Plasmodium falciparum* gametocytes in the placental blood of a woman with a peripheral parasitaemia." Ann Trop Med Parasitol **86**(2): 191-2.
- Diagne, N., C. Rogier, B. Cisse and J. F. Trape (1997). "Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission." Trans R Soc Trop Med Hyg **91**(2): 166-70.
- Engelbrecht, F., I. Felger, B. Genton, M. Alpers, et al. (1995). "*Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes." Exp Parasitol **81**(1): 90-6.
- Färnert, A., A. P. Arez, H. A. Babiker, H. P. Beck, et al. (2001). "Genotyping of *Plasmodium falciparum* infections by PCR: a comparative multicentre study." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(2): 225-32.
- Färnert, A., I. Rooth, Svensson, G. Snounou, et al. (1999). "Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children." J Infect Dis **179**(4): 989-95.
- Färnert, A., G. Snounou, I. Rooth and A. Bjorkman (1997). "Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area." Am J Trop Med Hyg **56**(5): 538-47.
- Favaloro, J. M., R. L. Coppel, L. M. Corcoran, S. J. Foote, et al. (1986). "Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*." Nucleic Acids Res **14**(21): 8265-77.
- Felger, I., T. Smith, D. Edoh, A. Kitua, et al. (1999). "Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 29-34.

- Fievet, N., M. Moussa, G. Tami, B. Maubert, et al. (2001). "Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta." J Infect Dis **183**(10): 1530-4.
- Finnstrom, O. (1977). "Studies on maturity in newborn infants. IX. Further observations on the use of external characteristics in estimating gestational age." Acta Paediatr Scand **66**(5): 601-4.
- Fleming, A. F. (1989). "The aetiology of severe anaemia in pregnancy in Ndola, Zambia." Ann Trop Med Parasitol **83**(1): 37-49.
- Fried, M. and P. E. Duffy (1996). "Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta." Science **272**(5267): 1502-4.
- Fried, M. and P. E. Duffy (2002). "Analysis of CSA-binding parasites and antiadhesion antibodies." Methods Mol Med **72**: 555-60.
- Fried, M., R. O. Muga, A. O. Misore and P. E. Duffy (1998). "Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes." J Immunol **160**(5): 2523-30.
- Fried, M., F. Nosten, A. Brockman, B. J. Brabin, et al. (1998). "Maternal antibodies block malaria." Nature **395**(6705): 851-2.
- Gilles, H. (1991). Management of severe and complicated malaria. Genf, World Health Organisation.
- Gillespie, D. A. and Hardman (1979). "Microbubbles in replicating nuclear deoxyribonucleic acid from Physarum polycephalum." N Biochem J **183**: 477-480.
- Granja, A., F. Machungo, A. Gomes, B. Brabin, et al. (1998). "Malaria-related maternal mortality in urban Mozambique." Ann Trop Med Parasitol **92**(2): 257-263.
- Greenwood, B. (2002). "The molecular epidemiology of malaria." Trop Med Int Health **7** no 12: 1012-1021.
- Gupta, S. and A. V. Hill (1995). "Dynamic interactions in malaria: host heterogeneity meets parasite polymorphism." Proc R Soc Lond B Biol Sci **261**(1362): 271-7.
- Gupta, S., A. V. Hill, D. Kwiatkowski, A. M. Greenwood, et al. (1994). "Parasite virulence and disease patterns in Plasmodium falciparum malaria." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3715-9.
- Haddad, D., G. Snounou, D. Mattei, I. G. Enamorado, et al. (1999). "Limited genetic diversity of Plasmodium falciparum in field isolates from Honduras." Am J Trop Med Hyg **60**(1): 30-4.
- Hill, A. V., C. E. Allsopp, D. Kwiatkowski, N. M. Anstey, et al. (1991). "Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria." Nature **352**(6336): 595-600.
- Hill, W. G., H. A. Babiker, L. C. Ranford-Cartwright and D. Walliker (1995). "Estimation of inbreeding coefficients from genotypic data on multiple alleles, and application to estimation of clonality in malaria parasites." Genet Res **65**(1): 53-61.
- Holder, A. A., J. A. Guevara Patino, C. Uthaipibull, S. E. Syed, et al. (1999). "Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria." Parassitologia **41**(1-3): 409-14.
- Jacobs, R. (1964). "Role of p-aminobenzoic acid in Plasmodium berghei infection in the mouse." Exp Parasitol **15**: 213-225.
- James, S. P., W. D. Nicol and P. G. Shute (1932). "A study of induced malignant tertian malaria." Proc of the Royal Society of Medicine **25**: 1153-1181.
- Kamwendo, D. D., F. K. Dzinjalama, G. Snounou, M. C. Kanjala, et al. (2002). "Plasmodium falciparum: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(2): 145-9.
- Kassberger, F., A. Birkenmaier, A. Khattab, P. G. Kremsner, et al. (2002). "PCR typing of Plasmodium falciparum in matched peripheral, placental and umbilical cord blood." Parasitol Res **88**(12): 1073-9.

- Keitel, W. A., K. E. Kester, R. L. Atmar, A. C. White, et al. (1999). "Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid." Vaccine **18**(5-6): 531-9.
- Kitua, A. Y., T. Smith, P. L. Alonso, H. Masanja, et al. (1996). "*Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission." Trop Med Int Health **1**(4): 475-84.
- Konate, L., J. Zwetyenga, C. Rogier, E. Bischoff, et al. (1999). "Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 21-8.
- Kulmala, T., M. Vaahtera, M. Ndekha, A. M. Koivisto, et al. (2000). "The importance of preterm births for peri- and neonatal mortality in rural Malawi." Paediatr Perinat Epidemiol **14**(3): 219-26.
- Lang, W. and T. Löscher (2000). Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Stuttgart, New York, Thieme.
- Leke, R. F., R. R. Djokam, R. Mbu, R. J. Leke, et al. (1999). "Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria." J Clin Microbiol **37**(9): 2992-6.
- Lindsay, S., J. Ansell, C. Selman, V. Cox, et al. (2000). "Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes." Lancet **355**(9219): 1972.
- Matteelli, A., S. Caligaris, F. Castelli and G. Carosi (1997). "The placenta and malaria." Ann Trop Med Parasitol **91**(7): 803-10.
- Maubert, B., N. Fievet, G. Tami, M. Cot, et al. (1999). "Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women." Infect Immun **67**(10): 5367-71.
- May, J., F. P. Mockenhaupt, O. G. Ademowo, A. G. Falusi, et al. (1999). "High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria." Am J Trop Med Hyg **61**(2): 339-43.
- McGregor, I. A. (1984). "Epidemiology, malaria and pregnancy." Am J Trop Med Hyg **33**(4): 517-25.
- McKenna, K. C., M. Tsuji, M. Sarzotti, J. B. Sacci, Jr., et al. (2000). "gamma delta T cells are a component of early immunity against preerythrocytic malaria parasites." Infect Immun **68**(4): 2224-30.
- Menendez, C., J. Ordi, M. R. Ismail, P. J. Ventura, et al. (2000). "The impact of placental malaria on gestational age and birth weight." J Infect Dis **181**(5): 1740-5.
- Mercereau-Puijalon, O. (1996). "Revisiting host/parasite interactions: molecular analysis of parasites collected during longitudinal and cross-sectional surveys in humans." Parasite Immunol **18**(4): 173-80.
- Meyer, C. G., J. May, A. P. Gil and V. d. Rosario (2002). "Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages." Trop Med Int Health **7**no 5: 395-408.
- Miller, L. H. (1994). "Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2415-9.
- Mockenhaupt, F. P., J. May, U. Bienzle and C. G. Meyer (1997). "[Drug-resistant malaria]." Dtsch Med Wochenschr **122**(42): 1293-7.
- Mockenhaupt, F. P., B. Rong, H. Till, T. A. Eggelte, et al. (2000). "Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana." Trop Med Int Health **5**(3): 167-73.
- Mockenhaupt, F. P., U. Ulmen, C. von Gaertner, G. Bedu-Addo, et al. (2002). "Diagnosis of placental malaria." J Clin Microbiol **40**(1): 306-8.
- Ntoumi, F., H. Contamin, C. Rogier, S. Bonnefoy, et al. (1995). "Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections." Am J Trop Med Hyg **52**(1): 81-8.
- Nuske, J. H. (1999). BioDocAnalyse-Biometra-Handbuch-deutsche Version. Göttingen: 3-65.

- Ofosu-Okyere, A., M. J. Mackinnon, M. P. Sowa, K. A. Koram, et al. (2001). "Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season." *Parasitology* **123**(Pt 2): 113-23.
- Ordi, J., M. R. Ismail, P. J. Ventura, E. Kahigwa, et al. (1998). "Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection." *Am J Surg Pathol* **22**(8): 1006-11.
- Pasvol, G., D. Weatherall, R. Wilson, D. Smith, et al. (1976). "Fetal haemoglobin and malaria." *Lancet* **5**(1): 1269-1272.
- Petersen, E., B. Hogh, N. T. Marbiah, K. David, et al. (1991). "Development of immunity against *Plasmodium falciparum* malaria: clinical and parasitologic immunity cannot be separated." *J Infect Dis* **164**(5): 949-53.
- Peyerl-Hoffmann, G., T. Jelinek, A. Kilian, G. Kabagambe, et al. (2001). "Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda." *Trop Med Int Health* **6**(8): 607-13.
- Polge, L. G. and J. V. Ravetch (1988). "Large deletions result from breakage and healing of *P. falciparum* chromosomes." *Cell* **55**(5): 869-74.
- Reed, S. C., J. J. Wirima and R. W. Steketee (1994). "Risk factors for anemia in young children in rural Malawi." *Am J Trop Med Hyg* **51**(2): 170-4.
- Reeder, J. C., A. F. Cowman, K. M. Davern, J. G. Beeson, et al. (1999). "The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5198-202.
- Ricke, C. H., T. Staalsoe, K. Koram, B. D. Akanmori, et al. (2000). "Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A." *J Immunol* **165**(6): 3309-16.
- Riley, E. M., G. Schneider, I. Sambou and B. M. Greenwood (1989). "Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women." *Am J Trop Med Hyg* **40**(2): 141-4.
- Robert, F., F. Ntoumi, G. Angel, D. Candito, et al. (1996). "Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**(6): 704-11.
- Rogerson, S. J., H. C. Brown, E. Pollina, E. T. Abrams, et al. (2003). "Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women." *Infect Immun* **71**(1): 267-70.
- Rogier, C., D. Commenges and J. F. Trape (1996). "Evidence for an age-dependent pyrogenetic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations." *American Journal of Tropical Medicine* **54**: 613-619.
- Roper, C., W. Richardson, I. M. Elhassan, H. Giha, et al. (1998). "Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village." *Parasitology* **116** (Pt 6): 501-10.
- Ross, R. (1910). "The Prevention of Malaria." *London: John Murray*.
- Rowe, A., J. Obeiro, C. I. Newbold and K. Marsh (1995). "*Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya." *Infect Immun* **63**(6): 2323-6.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-4.
- Saute, F., C. Menendez, A. Mayor, J. Aponte, et al. (2002). "Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections." *Trop Med Int Health* **7**(1): 19-28.
- Schenk, H. v., M. Falkensson and B. Lundberg (1986). "Evaluation of 'HemoCue', a new device for determining hemoglobin." *Clin Chem* **32**(3): 526-529.
- Scherf, A., B. Pouvelle, P. A. Buffet and J. Gysin (2001). "Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion." *Cell Microbiol* **3**(3): 125-31.

- Schleiermacher, D., J. Y. Le Hesran, J. L. Ndiaye, R. Perraut, et al. (2002). "Hidden *Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta." Infect Genet Evol **2**(2): 97-105.
- Schleiermacher, D., C. Rogier, A. Spiegel, A. Tall, et al. (2001). "Increased multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and skewed distribution of individual msp1 and msp2 alleles during pregnancy in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria." Am J Trop Med Hyg **64**(5-6): 303-9.
- Schofield, L., P. Gerold, R. T. Schwarz and S. Tachado (1994). "Signal transduction in host cells mediated by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa, or why do the parasitic protozoa have so many GPI molecules?" Braz J Med Biol Res **27**(2): 249-54.
- Shulman, C. E., T. Marshall, E. K. Dorman, J. N. Bulmer, et al. (2001). "Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birthweight in primigravidae and multigravidae." Trop Med Int Health **6**(10): 770-8.
- Smith, J. D., C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, et al. (1995). "Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes." Cell **82**(1): 101-10.
- Smith, T., H. P. Beck, A. Kitua, S. Mwankusye, et al. (1999). "Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 15-20.
- Smith, T., J. D. Charlwood, J. Kihonda, S. Mwankusye, et al. (1993). "Absence of seasonal variation in malaria parasitaemia in an area of intense seasonal transmission." Acta Trop **54**(1): 55-72.
- Smith, T., I. Felger, A. Kitua, M. Tanner, et al. (1999). "Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 35-9.
- Smith, T., I. Felger, M. Tanner and H. P. Beck (1999). "Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 59-64.
- Smythe, J. A., M. G. Peterson, R. L. Coppel, A. J. Saul, et al. (1990). "Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **39**(2): 227-34.
- Snounou, G. and H.-P. Beck (1998). "The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial treatment." Parasitology Today **14**(4): 462-467.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, et al. (1993). "High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction." Mol Biochem Parasitol **61**(2): 315-20.
- Snounou, G., X. Zhu, N. Siripoon, W. Jarra, et al. (1999). "Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand." Trans R Soc Trop Med Hyg **93**(4): 369-74.
- Soe, S., A. Khin Saw, A. Htay, W. Nay, et al. (2001). "Premunition against *Plasmodium falciparum* in a malaria hyperendemic village in Myanmar." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(1): 81-4.
- Strickland, G. T., E. Fox and H. Hadi (1988). "Malaria and splenomegaly in the Punjab." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(5): 667-70.
- Sullivan, A. D., T. Nyirenda, T. Cullinan, T. Taylor, et al. (1999). "Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi." J Infect Dis **179**(6): 1580-3.
- Tanabe, K., M. Mackay, M. Goman and J. G. Scaife (1987). "Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." J Mol Biol **195**(2): 273-87.
- Tanner, M., H. P. Beck, I. Felger and T. Smith (1999). "The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 1. General introduction." Trans R Soc Trop Med Hyg **93 Suppl 1**: 1-2.

- Tian, L. P., E. A. Nelson, A. C. Senok, L. M. Yu, et al. (1998). "Red cell age and susceptibility to malaria during pregnancy." Acta Obstet Gynecol Scand **77**(7): 717-21.
- Trape, J. F., C. Rogier, L. Konate, N. Diagne, et al. (1994). "The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal." Am J Trop Med Hyg **51**(2): 123-37.
- Vince, G. S. and P. M. Johnson (1996). "Immunobiology of human uteroplacental macrophages - friend and foe?" Placenta **17**(4): 191-9.
- Vleugels, M. P., B. Brabin, W. M. Eling and R. de Graaf (1989). "Cortisol and Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Kenya." Trans R Soc Trop Med Hyg **83**(2): 173-7.
- Wagner, G., K. Koram, D. McGuinness, S. Bennett, et al. (1998). "High incidence of asymptomatic malaria infections in a birth cohort of children less than one year of age in Ghana, detected by multicopy gene polymerase chain reaction." Am J Trop Med Hyg **59**(1): 115-23.
- WHO (1985). "World malaria situation 1983. Malaria Action Programme, World Health Organization, Geneva." World Health Stat Q **38**(2): 193-231.
- WHO (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." Trans R Soc Trop Med Hyg **94 Suppl 1**: S1-90.
- Witte, A. M., H. J. Klever, B. J. Brabin, T. A. Eggelte, et al. (1990). "Field evaluation of the use of an ELISA to detect chloroquine and its metabolites in blood, urine and breast-milk." Trans R Soc Trop Med Hyg **84**(4): 521-5.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Entwicklung einer Immunität und Prämunition (Smith <i>et al.</i> 1999) | 13 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des <i>msp-1</i> -Gens (Block 2) | 15 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>msp-2</i> -Gens | 15 |
| Abbildung 4: Antigenvariationen von mit <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten | 18 |
| Abbildung 5: Geographische Darstellung von Ghana und dem Studiengebiet | 22 |
| Abbildung 6: Geometrisches Mittel plazentarer Parasitendichten (GMPD) und Prävalenz submikroskopischer plazentarer Infektionen in Abhängigkeit zur Parität | 43 |
| Abbildung 7: Geometrisches Mittel der peripheren Parasitendichte bei plazentarer <i>P.-falciparum</i> -Infektion und Prävalenz submikroskopischer Infektionen sowie Anzahl peripher nicht nachweisbarer Infektionen | 44 |
| Abbildung 8: Verteilung der Genotypen in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten | 47 |
| Abbildung 9: Anzahl an <i>P.-falciparum</i> -Genotypen in plazentar und peripher gewonnenen Isolaten | 52 |
| Abbildung 10: Korrelation der Multiplizität der Infektion peripher und plazentar gewonnener Isolate in Bezug zum Alter, der Parität und der plazentaren Parasitendichte | 53 |
| Abbildung 11: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zum Stadium der plazentaren <i>P.-falciparum</i> -Infektion | 55 |
| Abbildung 12: Korrelation von Multiplizität der Infektion und Parasitendichten in Bezug zur Parität | 60 |
| Abbildung 13: Gelanalyse der PCR-Amplifikationsreaktionen des <i>msp-1</i> | 75 |
| Abbildung 14: Gelanalyse der PCR-Amplifikationsreaktionen des <i>msp-2</i> | 76 |
| Abbildung 15: Mögliche Mechanismen einer Sequestration von mit <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten | 88 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Reaktionsansätze: diagnostische (innere und äußere) PCR (<i>P. falciparum</i>) | 29 |
| Tabelle 2: Reaktionsschritte: diagnostische (innere und äußere) PCR (<i>P. falciparum</i>) | 29 |
| Tabelle 3: Reaktionsansätze der äußeren PCR (<i>msp-1</i> , <i>msp-2</i>) | 32 |
| Tabelle 4: Reaktionsschritte der äußeren PCR (<i>msp-1</i> , <i>msp-2</i>) | 33 |
| Tabelle 5: Reaktionsansätze der inneren PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC) | 33 |
| Tabelle 6: Reaktionsschritte der inneren PCR (K1, Mad20, Ro33 und FC27, IC) | 34 |
| Tabelle 7: Beispiele zur Bestimmung der Multiplizität der Infektion (MOI) | 36 |
| Tabelle 8: Einteilung der Genotypen | 37 |
| Tabelle 9: 2 x 2 Felder-Tafel unabhängiger Stichproben; Häufigkeiten (w, t, u, v) | 38 |
| Tabelle 10: 2 x 2 Felder-Tafel abhängiger Stichproben; Häufigkeiten (w, t, u, v) | 39 |
| Tabelle 11: Kenndaten der Gebärenden und Neugeborenen | 42 |
| Tabelle 12: Prävalenz aller Genotypen in plazentaren und peripheren Isolaten (statistischer Vergleich) | 45 |
| Tabelle 13: Prävalenz von IC-12, FC27-16, K1-10 und Mad20-06 im Bezug zum Wohnort | 48 |
| Tabelle 14: Prävalenz von Mad20-06, Mad20-08, FC 27-10, FC 27-16 und der Allelfamilie FC27 in Bezug zum Alter der Patientin | 49 |
| Tabelle 15: Prävalenz von K1-01, IC-14, IC-15, IC-19 im Bezug zum Plasmaspiegel von Chloroquin (CLQ) bzw. Pyrimethamin (PYR) | 49 |
| Tabelle 16: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC27 und einzelner Genotypen mit einer Anämie | 50 |
| Tabelle 17: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC27 und einzelner Genotypen mit einem LBW | 51 |
| Tabelle 18: Signifikante Assoziation der Allelfamilie FC 27 und einzelner Genotypen mit einer Frühgeburt | 51 |
| Tabelle 19: Abhängigkeit der plazentaren Parasitendichte von der Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) | 54 |
| Tabelle 20: Abhängigkeit der peripheren Parasitendichte von der Multiplizität der Infektion (perip. Isolat) | 54 |
| Tabelle 21: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und Anteil polyklonaler plazentarer Infektionen | 56 |
| Tabelle 22: Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) und Anteil polyklonaler peripherer Infektionen | 56 |
| Tabelle 23: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität | 57 |
| Tabelle 24: Multiplizität der Infektion (periph. Isolat) und prozentualer Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität | 57 |
| Tabelle 25: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Parität, getrennt nach Gruppen verschiedener Parasitendichten | 58 |
| Tabelle 26: Multiplizität der peripheren Infektion sowie Anteil polyklonaler Infektionen in | |

| | |
|--|----|
| Bezug zur Parität, getrennt nach Gruppen verschiedener Parasitendichten | 59 |
| Tabelle 27: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zum Wohnort der Patientin | 60 |
| Tabelle 28: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Regen- bzw. Trockenzeit | 61 |
| Tabelle 29: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zur Einnahme von Chloroquin und Pyrimethamin | 61 |
| Tabelle 30: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einer Anämie | 62 |
| Tabelle 31: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einer Frühgeburtlichkeit | 63 |
| Tabelle 32: Multiplizität der Infektion (plaz. Isolat) sowie Anteil polyklonaler Infektionen in Bezug zu einem LBW | 64 |
| Tabelle 33: Risikofaktoren für das Vorliegen einer Anämie ($Hb < 9 \text{ g/dl}$) | 67 |
| Tabelle 34: Risikofaktoren einer Frühgeburtlichkeit (gesamte Studiengruppe) | 68 |
| Tabelle 35: Risikofaktoren einer Frühgeburtlichkeit (Primiparae) | 69 |
| Tabelle 36: Risikofaktoren einer Frühgeburtlichkeit (Multiparae) | 70 |
| Tabelle 37: Risikofaktoren einer Frühgeburtlichkeit bei Patientinnen mit submikroskopischen plazentaren Infektionen | 71 |
| Tabelle 38: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichts (gesamten Studiengruppe) | 72 |
| Tabelle 39: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichtes (Primiparae) | 73 |
| Tabelle 40: Risikofaktoren eines verminderten Geburtsgewichtes (Multiparae) | 74 |

Bezugsquellen

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien, Reaktionsgefäße und Geräte stammen von den Firmen:

Amersham Buchler, Baunschweig
Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Falcon: Baxter Healthcare Corp., McGawPark, USA
Gibco Life Technologies GmbH, Eggersheim
Greiner KG, Frickenhausen
Kodak Ltd., Liverpool, UK
Merck KG, Darmstadt
Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, USA
Quiagen, Hilden
Roth, Karlsruhe
Sarstedt Inc., Newton, USA
Schleicher und Schell Inc., Keene, USA
Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA
Stratagene Cloning Systems, La Jolla, USA
Carl Zeiss, Esslingen

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, die mein Studium und die Anfertigung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben. Meinem Bruder Hagen möchte ich ebenfalls für seine Unterstützung danken.

Herrn PD Dr. med. K. Stark danke ich für die Überlassung des Themas und seine fortwährende wissenschaftliche Unterstützung.

Für ihre permanente Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei Dr. F. Mockenhaupt und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe des Instituts für Tropenmedizin Berlin, insbesondere bei Frau B. Jakob.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Presbyterian Mission Hospital Agogo in Ghana und den Frauen, die sich bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen

Bei der Sonnenfeldstiftung möchte ich mich für das Promotionsstipendium bedanken, welches die Verwirklichung der Arbeit um ein Vielfaches vereinfachte.

Die Firma Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen stellte freundlicherweise das in dieser Arbeit verwendeten Auswertungsprogramm BioDocAnalyse® zur Verfügung.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Polyklonale Infektionen mit *Plasmodium falciparum* in der Schwangerschaft:

Untersuchungen zur Diversität und Multiplizität von *Plasmodium-falciparum*-Infektionen bei Gebärenden aus dem holoendemischen Malariagebiet von Agogo (Ghana)“

im Institut für Tropenmedizin Berlin der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von PD Dr. med. K. Stark ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Ich bestätige, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt und die entsprechende Literatur vollständig angegeben zu haben.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, den 01.10.2003

Nils Eckert

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Nils Eckert
 Anschrift: 10437 Berlin, Lychener Str. 4
 Geburtsdatum: 24.01.1973
 Geburtsort: Berlin
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Ausbildung:

POS: 1979–1988 Berlin und Mittenwalde
 EOS: 1988–1991 Königs Wusterhausen
 Abitur: 1991 Königs Wusterhausen
 Erstimmatrikulation: 1994 Freie Universität Berlin
 3. Staatsexamen: 2000 Humboldt-Universität zu Berlin

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Praktikum: 1991-1992 Pennine Community / England
 Zivildienst: 1993–1994 Neurologische Abteilung
 Universitäts-Klinikum-R.-Virchow
 Famulaturen: 1997 Innere Medizin
 Bodden-Kliniken Ribnitz Dammgarten
 1998 Tropenmedizin
 Hospital Tropical de “Stadler Richter”
 Archidona – Ecuador
 1999 Allgemeinmedizin Arztpraxis Dr. U. Eckert

Praktisches Jahr:

Chirurgie 10/1999-02/2000 Abteilung für Allgemein-, Visceral- und
 Transplantationschirurgie (Charité
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Innere Medizin 02/2000-06/2000 Abteilung für Innere Medizin
 Hospital Britanico
 (Universidad de Buenos Aires / Argentinien)
 Anästhesiologie 07/2000-08/2000 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
 Josephs- Hospital Toronto
 (University of Toronto / Kanada)
 08/2000-09/2000 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
 Charité
 (Humboldt Universität zu Berlin)
 Arzt im Praktikum: 08.2002-07.2003 DRK-Klinikum Westend
 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
 Seit 01/2001 Promotion am Institut für Tropenmedizin Berlin